

СОДЕРЖАНИЕ

Том 46, номер 5, 2020

Обзор

- Симбиотические взаимоотношения микроводорослей зооксантелл и полипов рифостроящих кораллов в процессе автотрофного и гетеротрофного питания
Э. А. Титлянов, Т. В. Титлянова 291
- Репродуктивная стратегия раков-отшельников умеренных широт
Е. С. Корниенко 304
-

Оригинальные статьи

- Характеристика нагульного скопления горбатого кита *Megaptera novaeangliae* (Borowski, 1781) в проливе Сенявина у восточного побережья Чукотки по результатам фотоидентификации
О. В. Титова, И. Д. Федутин, О. А. Филатова, М. А. Антипин, А. М. Бурдин, Э. Хойт 315
- Рост, размерная структура популяции, физиологические изменения и ультраструктура микроводоросли *Picochlorum maculatum* (Chlorophyta) при сублетальных концентрациях меди
Ж. В. Маркина 323
- Разнообразие и антимикробная активность бактерий, выделенных из донных осадков Чукотского моря
Л. А. Романенко, В. В. Куриленко, Н. Ю. Чернышева, К. В. Гузев, В. В. Михайлов 329
- Вибриофлора гидробионтов и воды заливов Петра Великого (Японское море) и Нячанг (Южно-Китайское море)
И. А. Беленева 338
- Сравнение компьютерных методов для определения возраста животных
В. В. Суханов, Н. И. Селин 349
-

Краткие сообщения

- Активность О-гликозидгидролаз и других полисахарид-деградирующих ферментов у культивируемых бактериальных изолятов красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis* (Kanno et Matsubara, 1932) Makienko, 1970
И. Ю. Бакунина, О. И. Недашковская, Л. А. Балабанова, А. Д. Кухлевский, О. С. Белоус 357
-
-

Contents

Volume 46, No 5, 2020

Review

- Symbiotic Relationships between Microalgal Zooxanthellae and Reef-Building Coral Polyps in the Process of Autotrophic and Heterotrophic Nutrition
E. A. Titlyanov, T. V. Titlyanova 291
- Reproductive Strategy of Hermit Crabs in Temperate Waters
E. S. Kornienko 304
-

Original papers

- Characteristics of the Feeding Aggregation Formed by Humpback Whales, *Megaptera novaeangliae* (Borowski, 1781), in the Senyavin Strait, off Eastern Chukotka Coast, According to Photo-Identification Data
O. V. Titova, I. D. Fedutin, O. A. Filatova, M. A. Antipin, A. M. Burdin, E. Hoyt 315
- Growth, Population Size Structure, Physiological Changes and Ultrastructure of the Microalga *Picochlorum maculatum* (Chlorophyta) Under Sublethal Copper Concentrations
Zh. V. Markina 323
- Biodiversity and Antimicrobial Activity of Bacteria Isolated from the Bottom Sediments of the Chukchi Sea
L. A. Romanenko, V. V. Kurilenko, N. Yu. Chernysheva, K. V. Guzev, V. V. Mikhailov 329
- Vibrioflora of Hydrobionts and Waters of the Sea of Japan (Peter the Great Bay) and the South China Sea (Nha Trang Bay)
I. A. Beleneva 338
- A Comparison of Computer-Based Methods for Estimating Age of Animals
V. V. Sukhanov, N. I. Selin 349
-

Brief notes

- Activities of O-Glycoside Hydrolases and Other Polysaccharide-Degrading Enzymes of Cultivable Bacterial Isolates of the Pacific Red Alga *Ahnfeltia tobuchiensis* (Kanno et Matsubara, 1932) Makienko, 1970
I. Y. Bakunina, O. I. Nedashkovskaya, L. A. Balabanova, A. D. Kukhlevsky, O. S. Belous 357
-
-

СИМБИОТИЧЕСКИЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ЗООКСАНТЕЛЛ И ПОЛИПОВ РИФОСТРОЯЩИХ КОРАЛЛОВ В ПРОЦЕССЕ АВТОТРОФНОГО И ГЕТЕРОТРОФНОГО ПИТАНИЯ¹

© 2020 г. Э. А. Титлянов¹, *, Т. В. Титлянова¹

¹Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН,
Владивосток 690041, Россия

*e-mail: etitlyanov@mail.ru

Поступила в редакцию 07.12.2019 г.

После доработки 31.01.2020 г.

Принята к публикации 02.02.2020 г.

В обзоре обобщены результаты работ авторов и их коллег по совместным публикациям и исследованиям на коралловых рифах Индо-Пацифики, начиная с конца 1970-х годов. Экспериментальные полевые и лабораторные работы были проведены во время рейсов на НИС “Каллисто” и “Академик Александр Несмеянов”, а также на морских биологических станциях Японии, Китая, Вьетнама и Израиля. Основная цель этих исследований – получение данных о разнообразии и механизмах симбиотических связей между животным-“хозяином” и его внутриклеточными симбионтами при выполнении организмом наиболее важных жизненных функций.

Ключевые слова: рифостроящие кораллы, зооксантеллы, симбиотические взаимоотношения

DOI: 10.31857/S0134347520050101

Коралловые рифы – распространенная и наиболее продуктивная прибрежная экосистема в тропическом биогеографическом регионе (Lüning, 1990; Crossland et al., 1991; Литтлер и др., 1991; Fong, Paul, 2011; Stambler, 2011). Системообразующими организмами на коралловых рифах являются рифостроящие кораллы. К современным рифостроящим, или герматипным, кораллам относятся беспозвоночные животные представители таксономического типа Coelenterata, главным образом класса Anthozoa подкласса Hexacorallia (шестилучевые кораллы) отряда Scleractinia. Среди герматипных кораллов имеются представители других отрядов и даже классов кишечнополостных (Veron, 1986), однако большинство среди рифостроителей представляют склерактинии и именно они являются предметом нашего исследования (рис. 1).

Склерактиниевые кораллы – главным образом колониальные животные. Жизненной формой кораллов является полип (рис. 2а, 2б), имеющий бокаловидное тело с ротовым диском в верхней его части и с подошвой на противоположном конце. В центре диска находится рот, а по его периферии располагаются щупальца. Рот ведет в кишечную полость, которая представлена склад-

ками ткани мезентерия. Наружная поверхность полипа от щупалец до подошвы покрыта тканью, состоящей из двух рядов клеток: эктодермы и эндодермы. В каждой эндодермальной клетке ткани полипа содержится от одной до трех-четырёх клеток симбиотических водорослей – зооксантелл (рис. 2в). Живая ткань покрывает наружный карбонатный скелет колонии коралловых полипов (Veron, 1986).

У склерактиниевых кораллов зооксантеллы – это в основном разные генетически детерминированные формы одноклеточной водоросли *Symbiodinium microadriaticum* LaJeunesse, относящейся к семейству Symbiodiniaceae порядка Süssiales класса Dinophyceae (Stambler, 2011). Зооксантелла обладает одним хлоропластом сложной формы с одним или двумя пиреноидами (рис. 2в). Хлоропласт содержит фотосинтетические пигменты, свойственные всем динофлагеллатам: хлорофиллы *a* и *c*², перидинин, диадиноксантин, диноксантин и β-каротин (Звалинский и др., 1978; Titlyanov et al., 1980). Отличительной структурой симбиотической клетки является большое аккумулятивное тело сферической формы, служащее для “сброса” отходов метаболизма. Запасные вещества зооксантелл – это жиры, находящиеся в цитоплазме в виде капель, и крахмалоподобный полисахарид, располагающийся преимущественно по периферии белкового тела пиреноида.

¹ Публикуется в связи с 50-летием Института биологии моря (в настоящее время – НИЦМБ им. А.В. Жирмунского ДВО РАН).

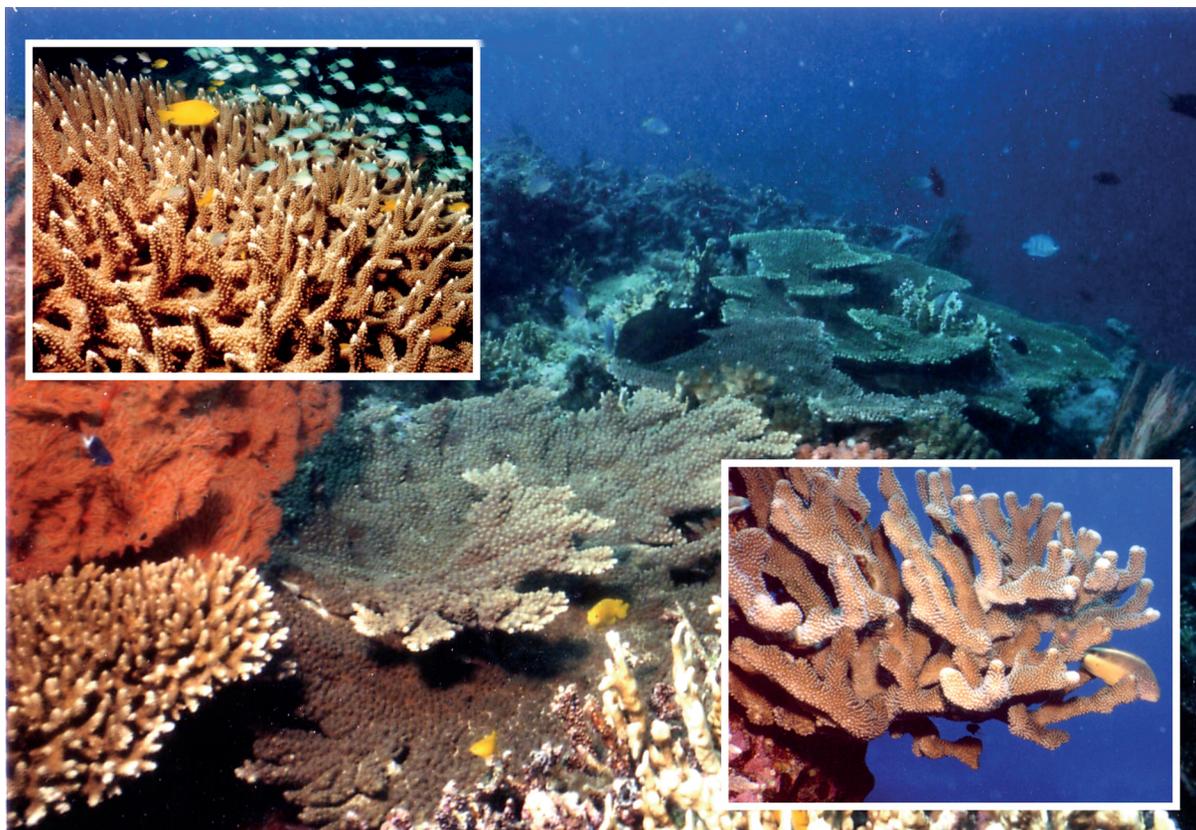


Рис. 1. Коралловый риф, остров Сесоко, Япония, глубина 5 м, май 1995 г.

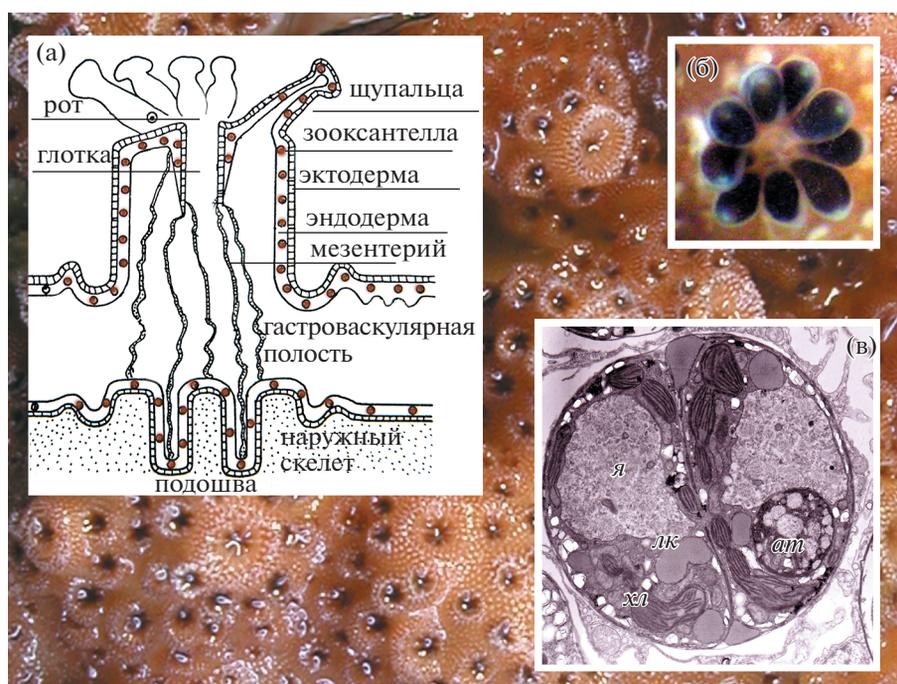


Рис. 2. Морфология и анатомия полипов склерактиниевого коралла *Acropora* sp. а – анатомия полипа; б – полип с выпущенными щупальцами; в – клетка зооксантеллы в стадии деления. Условные обозначения здесь, а также на рис. 3 и 4: я – ядро, хл – хлоропласты, ат – аккумулятивное тело, лк – липидные капли.

В клетках кораллов зооксантеллы находятся в виде неподвижной цисты. Симбионты передаются от родителей к потомству с половыми продуктами, а также асексуально с планулами или почками (Сорокин, 1990; Titlyanov et al., 1998, 2001a; Harrison, 2011). Установлено, что взрослые полипы могут инфицироваться зооксантеллами из морской воды (Colley, Trench, 1985). Животное-полип и водоросли-зооксантеллы находятся в симбиотических взаимовыгодных (мутуалистических) отношениях (Титлянов, 1999; Титлянов, Титлянова, 2002а, 2002б). Эти взаимоотношения настолько глубокие, что колония коралловых полипов может пройти весь жизненный цикл как организм лишь при сосуществовании животного и водорослей. При разрыве функциональных связей между животными клетками полипа и водорослями полип погибает.

Целью настоящего обзора является анализ опубликованных ранее нами и нашими коллегами данных о разнообразии симбиотических связей между животным-«хозяином» и его внутриклеточными симбионтами при выполнении организмом наиболее важных жизненных функций.

ЗООКСАНТЕЛЛЫ В ГЕРМАТИПНЫХ КОРАЛЛАХ

Морфофизиологические формы зооксантелл

Три морфофизиологические формы симбиотических динофлагеллят, различающихся по морфологии, физиологии и биохимии, были найдены в герматипных кораллах на краевом рифе о-ва Сесоко (Окинава, Япония): форма «L» (крупные), форма «B» (бурые) и форма «G» (зеленые) (рис. 3).

Колонии гидрокоралла *Millepora intricata* содержали симбионты только формы «L», склерактиниевые кораллы содержали симбионты форм «B» и «G» (Titlyanov et al., 2001b). Клетки формы «L» имели сферическую форму, их диаметр составлял более 15 мкм; цвет водорослей варьировал от темно-бурого до светло-коричневого. Сферические, золотисто-коричневые клетки формы «B» были меньше клеток формы «L», их размер составлял 8–14 мкм.

Размер клеток формы «G» был наименьшим — от 7 до 11 мкм; оливковые или зеленые клетки имели овальную форму. Все три типа зооксантелл, обитавших в одинаковых условиях освещения, значительно различались по химико-физиологическим показателям. Так, например, симбионты формы «L» аккумулировали наибольшее количество фотосинтетических пигментов — до 19.8 мкг/мм³ объема клетки. Наименьшее количество пигментов было найдено в зооксантеллах формы «G» — 1.3 мкг/мм³ объема клетки. Сравнение фотосинтетических возможностей всех трех типов водорослей *in hospite* (в кораллах, акклиматизированных к 30% фотосинтетически активной ра-

диации, падающей на поверхность воды, — ФАРп) показало, что наибольшей скоростью валового фотосинтеза (211 мкгО₂/мм³ объема клетки в час) обладали симбионты формы «G»; скорость валового фотосинтеза у симбионтов формы «L» была в 3.5 раза меньше (Titlyanov et al., 2001b).

Обоснованность выделения морфофункциональных форм клеток «G» и «B» была подтверждена молекулярно-генетическими методами (Loh et al., 2002), а также анализом липидов и жирных кислот (Zhukova, Titlyanov, 2003, 2006). Мы показали также, что симбионты форм «G» и «B» обитают во всех изученных нами склерактиниевых кораллах, а количество и соотношение данных форм в тканях полипов зависит преимущественно от освещенности в месте обитания (Titlyanov et al., 2001b).

Репродукция и деградация зооксантелл

В эндодерме коралла, находящегося в стабильных условиях, в течение суток можно обнаружить зооксантеллы на разных этапах онтогенеза: ~90% взрослых активно функционирующих клеток, 1–3% делящихся клеток и 1–3% деградирующих клеток (Titlyanov et al., 1996; Leletkin et al., 1999; Титлянов и др., 2006). Диаметр взрослых клеток разных видов герматипных кораллов изменяется от 7 до 17 мкм, а цвет варьирует от светло-оливкового до темно-бурого (Titlyanov et al., 2001b).

Зооксантеллы в тканях полипа воспроизводятся путем митотического деления материнской клетки на две дочерние. Делящиеся клетки встречаются в эндодерме всех органов полипа. Клетки делятся, как правило, ночью, максимум деления приходится на середину ночи (Titlyanov et al., 1996). Деление зооксантелл в теле полипа — циклический процесс, он имеет четыре типа периодичности (Titlyanov et al., 2000a; Титлянов и др., 2006). Первый тип периодичности, изученный на коралле *Seriatopora caliendrum*, представляет собой суточные колебания интенсивности процесса с максимумом в ночное время. Второй тип периодичности, описанный нами на *S. caliendrum* и гидрокоралле *M. intricata*, — это колебание интенсивности деления клеток с периодом 3 сут. Третий тип периодичности — колебание деления клеток симбионтов с периодом 5–6 сут, а четвертый — 15–20 сут.

В эндодерме всех органов коралловых полипов встречаются зооксантеллы с признаками деградации. В стационарных природных условиях количество таких клеток обычно равно числу вновь образованных клеток (Titlyanov et al., 1996).

АВТОТРОФНОЕ ПИТАНИЕ КОРАЛЛОВ

Герматипные кораллы имеют несколько способов питания: 1) утилизация продуктов фотосинтеза зооксантелл, 2) питание продуктами охоты

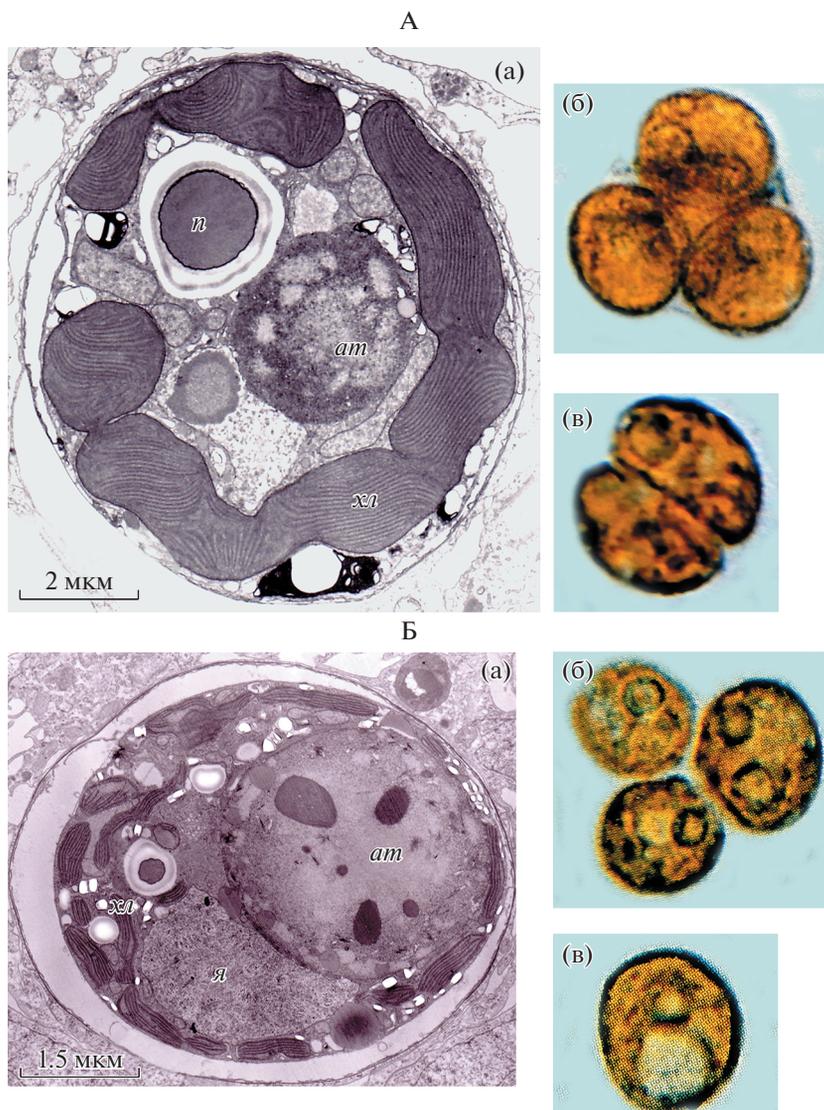


Рис. 3. Морфофункциональные типы зооксантелл коралла *Stylophora pistillata*. А – форма “В” (а – ультраструктура клетки, б – зооксантеллы в клетке животного, в – делящаяся клетка); Б – форма “Г” (а – ультраструктура клетки, б, в – морфология клеток). Условное обозначение: *n* – пиреноид.

(хищничество), 3) питание органическими седиментами животного происхождения, 4) поглощение растворенного органического вещества (РОВ) и 5) использование продуктов деградации зооксантелл (Титлянов, Титлянова, 2002а, 2002б).

Первичные, промежуточные и конечные продукты фотосинтеза зооксантелл и их использование полипом

На фрагментах колоний склерактиниевых кораллов *Stylophora pistillata* и *Seriatopora caliendrum* и зооксантелл, выделенных из них методом радиоуглеродного анализа, установлено, что первичная фотоассимиляция углерода коралловыми динофлагеллятами происходит в восстановительном пентозофосфатном цикле. Самыми ранними

промежуточными продуктами фотосинтеза были 3-фосфоглицериновая кислота и фосфорные эфиры сахаров, а конечными продуктами – гексозы, глицерол и аминокислоты (глицин, серин, аланин, аспаргат, глутамат, яблочная кислота). При длительной экспозиции на сильном свете (80–60% ФАРп) преобладал синтез гексоз (глюкозы, сахарозы, фруктозы), на слабом свете (10–5% ФАРп) в конечных продуктах фотосинтеза преобладал глицерол (Биль и др., 1991; Eden et al., 1996; Malkin et al., 1996; Titlyanov et al., 2000а). Продукты фотосинтеза накапливаются в виде крахмала в хлоропластах и в виде липидных капель в цитоплазме, а также экскретируются в цитоплазму животной клетки и используются в ней или транспортируются в другие клетки кораллового полипа (Muscatine, Cernichiari, 1969; Patton et al.,

1977; Blanquet et al., 1979; Биль и др., 1991). Продукты фотосинтеза зооксантелл составляют от 30 до 90% всей пищи коралловых полипов (Muscatine et al., 1983; Muscatine, 1990). Однако первичные продукты фотосинтеза зооксантелл бедны соединениями азота, при этом в них отсутствует фосфор, что ограничивает их прямое использование в синтезе многих сложных высокомолекулярных веществ и дает основание отнести к разряду “пустой” пищи.

Сорокин (1990) на основании собственных и литературных данных, полученных при исследовании коралловых рифов морей Индо-Пацифики, показал, что в среднем для рифостроящих кораллов этого региона валовый фотосинтез, измеренный в середине дня, составлял 10–50 мкг $O_2/см^2$ поверхности коралла в час, достигая иногда 100 мкг $O_2/см^2$ в час. В наших экспериментах на ветвистых кораллах *S. pistillata*, *Pocillopora verrucosa* и *P. damicornis* было показано, что кораллы, обитающие в световом диапазоне от 90–80 до 30–20% ФАРп, имели близкий уровень валового фотосинтеза в середине солнечного дня – в пределах 90–150 мг $C/м^2$ в час. Это свидетельствует об эффективной онтогенетической адаптации кораллов к свету, падающему в месте обитания, обеспечивающей стабильный уровень первичной продукции кораллов в широком световом диапазоне (Titlyanov, 1991b). Скорость и направленность фотосинтеза зооксантелл может регулироваться так называемым “хост-фактором” – комплексом веществ, синтезируемых клетками хозяина (Muscatine, 1967), что подтверждено и нашими исследованиями (Malkin et al., 1996).

Адаптация рифостроящих кораллов к свету

Рациональные формы колоний, эффективно поглощающих свет различной интенсивности, и разнообразие способов питания позволяют рифостроящим кораллам обитать в пределах почти всей фотической зоны шельфа при освещенности от 100 до $\geq 0.3\%$ ФАРп. Анализ распределения 64 видов рифостроящих кораллов на коралловых рифах островов Антхой, Тхотю и Кондао в Южно-Китайском море показал, что все найденные виды обитали в диапазоне освещенности от 30 до 3% ФАРп, 50% видов – от 95 до 10% ФАРп и только несколько видов кораллов из рода *Porites* были найдены в гротах при освещенности около 0.3% ФАРп (Титлянов и др., 1988a; Titlyanov, Laturov, 1991).

Широкий световой диапазон распространения рифостроящих кораллов и их эффективная адаптация к свету во многом обусловлены симбиотическими взаимоотношениями растительной и животной компонент в коралловых полипах. Способность кораллов адаптироваться к количеству и качеству света заложена в геномах животных и растительных клеток; она проявляется на всех

этапах онтогенетического развития организма. В симбиотическом организме рифостроящего коралла и симбионт, и хозяин участвуют в адаптационном процессе. В онтогенетической адаптации кораллов к свету проявляются мутуалистические взаимоотношения животных и растительных клеток. Фотоадаптивные реакции – это изменения в структуре и функциях организма, происходящие под влиянием света и направленные на жизнеобеспечение организма в данных условиях обитания. В природе адаптация кораллов к свету в процессе онтогенеза возможна при закреплении планул кораллов на грунте и при их развитии в колонию коралловых полипов (Titlyanov et al., 1998), при самозатенении в процессе роста и формирования колоний ветвистых кораллов (Titlyanov, 1991a), при затенении другими колониями или талломами макрофитов (Титлянов и др., 1988a; Titlyanov, Laturov, 1991), во время сезонных изменений освещенности, а также после сильных штормов, способных разрушить или оторвать колонии кораллов от грунта и переместить их или фрагменты кораллов в другое место.

При описании онтогенетической адаптации рифостроящих кораллов к свету мы рассматриваем ее пути, механизмы и реакции. Путь, или направления адаптации характеризует весь комплекс механизмов и реакций адаптации, наблюдающихся в определенном диапазоне освещенности. На основании анализа распределения отдельных видов кораллов на шельфе в зависимости от освещенности нами были выделены три направления адаптации кораллов к количеству света: 1) к умеренному затенению (50–10% ФАРп), 2) к крайне слабому свету ($\leq 5\%$ ФАРп) и 3) к яркому свету ($\geq 70\%$ ФАРп).

Адаптация к умеренному затенению (50–10% ФАРп)

Максимизация поглощения ФАР и рациональная утилизация поглощенной ФАР являются двумя доказанными и наиболее изученными механизмами фотоакклимации кораллов к умеренному затенению. В механизме максимизации поглощения ФАР участвует большое количество адаптивных реакций, происходящих на морфологическом, анатомическом, ультраструктурном и молекулярном уровнях, которые способствуют максимальному (часто полному) поглощению солнечной радиации, достигающей колонии коралла. Было показано, что общим морфологическим признаком глубоководных и затененных колоний кораллов является их уплощенная форма, наиболее эффективная при поглощении слабого света (Barnes, Taylor, 1973; Graus, Macintyre, 1976, 1982; Dustan, 1979).

В наших исследованиях масса колоний ветвистых кораллов *P. verrucosa* и *S. pistillata*, обитавших в затененных местах, была меньше, чем хорошо освещенных (Титлянов, 1987). Влияние недостатка света на морфологию колоний проявлялось

также в увеличении отношения максимального диаметра колонии к ее высоте, в меньшем количестве ветвей последующих порядков на ветвях предыдущих порядков и в уплощенной форме ветвей.

Одна из адаптивных реакций животного-полипа, максимизирующая поглощение падающего света зооксантеллами, — формирование на щупальцах у некоторых видов кораллов специальных светопринимающих органов (тонкостенных пузырей), содержащих зооксантеллы, которые полип способен “распускать” или “сжимать” в зависимости от освещенности (Vareschi, Friske, 1986).

Наиболее общей адаптивной реакцией рифостроящих кораллов и других бентосных животных, содержащих зооксантеллы, направленной на максимизацию поглощения света, является увеличение плотности популяции симбионтов в тканях хозяина. Показано, что в наружных ветвях кораллов, обитающих в затенении или на средних глубинах при освещенности 60–30% ФАРп, плотность зооксантелл больше, чем у кораллов с освещенного мелководья (100–80% ФАРп) (Звалинский и др., 1978; Титлянов и др., 1978; Titlyanov et al., 1980; Титлянов и др., 1983; Титлянов и др., 1988а, 1988б; Титлянов и др., 1990; Titlyanov, 1991а; Letetkin et al., 1999; Titlyanov et al., 1999, 2001а, 2001б). Плотность популяции зооксантелл у колоний кораллов с освещенного мелководья и из затененных мест или с большой глубины может различаться более чем в два раза. В экспериментах накопление зооксантелл в клетках эндодермы коралловых фрагментов проявлялось уже на следующие сутки после пересадки фрагментов колоний с яркого на умеренный свет и продолжалось в течение 30–40 сут (Titlyanov et al., 2001с).

Плотность популяции зооксантелл в ткани кораллового полипа зависит преимущественно от интенсивности процессов деления и деградации зооксантелл. Если скорость деления зооксантелл выше скорости их деградации, плотность популяции симбионтов увеличивается. Подсчитано, что при постоянной плотности популяции зооксантелл в ткани полипа доля вновь образованных клеток в течение 1 сут составляет 2–4% от их общего количества, что почти совпадает с количеством деградирующих клеток (Titlyanov et al., 1996; Титлянов и др., 2006).

Выдерживание фрагментов коралла *S. pistillata* в морской воде, обогащенной питательными веществами, содержащими азот и фосфор, а также кормление полипов зоопланктоном стимулировало процесс накопления зооксантелл в ткани коралла на слабом свету (Titlyanov et al., 2000а, 2001d), а голодание тормозило этот процесс (Titlyanov et al., 2000б, 2001d). Мы предполагаем, что полип путем дозированного снабжения симбионтов соединениями азота и фосфора, необходимыми в процессе деления и роста симбиотических

клеток (Titlyanov et al., 2000а), а также изменением уровней деления и деградации зооксантелл может регулировать плотность их популяции. Не исключено также и стимулирующее действие на процесс деления клеток симбионтов “хост фактора” (Muscatine, 1967).

Одной из наиболее эффективных реакций максимизации поглощения света зооксантеллами является увеличение в хлоропластах содержания всех фотосинтетических пигментов без существенных сдвигов в их соотношении, что позволяет предположить, что в данном процессе происходит построение тилакоидных мембран *de novo*. Содержание фотосинтетических пигментов у зооксантелл, выделенных из колоний с большой глубины, из затенения и с открытого мелководья, может различаться в расчете на клетку более чем в 2–2.5 раза (Titlyanov et al., 1980, 1999, 2001а, 2001б, 2001с; Титлянов и др., 1981). При накоплении пигментов у зооксантелл увеличиваются концентрация тилакоидных мембран в хлоропластах (Машанский и др., 1979) и размеры фотосинтетических единиц (ФСЕ) (Звалинский, 1988).

Эксперименты, проведенные на фрагментах колоний *S. pistillata* при перенесении их с яркого (95% ФАРп) света на умеренный (30% ФАРп), показали, что накопление пигментов начинается сразу после снижения уровня освещенности и прекращается на 4–5-е сутки эксперимента. Прямого влияния животного-хозяина на скорость или характер накопления фотосинтетических пигментов в симбионтах нами не отмечено.

Эффективная утилизация поглощенной ФАР (уменьшение энергетических потерь при превращении энергии квантов в энергию химических связей), как и максимизация поглощения ФАР, является механизмом адаптации кораллов к пониженной интенсивности света. Было показано (Лелеткин и др., 1980), что при снижении освещенности в месте обитания квантовая эффективность фотосинтеза зооксантелл на линейном участке световой кривой повышается более чем в 2 раза. Предполагают, что увеличение квантового выхода фотосинтеза обеспечивают следующие реакции: увеличение доли высоко агрегированных длинноволновых форм хлорофиллов и перидинина по сравнению с таковой коротковолновых формам, а также относительно большее накопление пигментов-светосборщиков (хлорофиллов и перидинина), чем пигментов-протекторов (диноксантина, диадиноксантина, β-каротина) (Звалинский и др., 1978; Titlyanov et al., 1980).

На этапе превращения первичных продуктов фотосинтеза в вещества, расходуемые на рост и развитие организмов, мы предполагаем, по крайней мере, две реакции адаптации к пониженной интенсивности света. Первая — это увеличение включения во вторичные синтезы и процесс катаболизма промежуточных продуктов фотосинтеза без их предварительного восстановления и поли-

меризации до запасных углеводов и жиров (Биль и др., 1991; Bil et al., 1992; Titlyanov et al., 2000a), вторая – снижение энергетических затрат на дыхание (Титлянов и др., 1988б; Leletkin et al., 1996).

Адаптация кораллов к крайне низкой интенсивности света ($\leq 5\%$ ФАРп)

Большинство видов рифостроящих кораллов способны обитать при крайне низкой освещенности – приблизительно до 0.3% ФАРп (Титлянов и др., 1988а; Titlyanov, Laturov, 1991). При снижении интенсивности света в месте обитания кораллов, например, с 30% ФАРп до 1% ФАРп уже не действуют такие реакции адаптации к низкой интенсивности света, как накопление пигментов в зооксантеллах или накопление зооксантелл в тканях коралловых полипов, которые функционировали в зоне светового комфорта ($80\text{--}20\%$ ФАРп). При экстремально низкой интенсивности света выгода от этих адаптивных изменений минимальна, а расходы энергии и вещества значительны. Основные реакции адаптации кораллов к крайне слабому свету – это сокращение расходов энергии на рост и жизнеобеспечение кораллов, а также снижение плотности популяции симбионтов (Titlyanov et al., 2002).

В природе масса колоний кораллов *P. damicornis* и *P. verrucosa*, обитающих при освещенности около 5% ФАРп, в $1.5\text{--}2.5$ раза меньше, массы колоний, обитающих в зоне светового комфорта. Отношение площади поверхности колонии к ее массе у колоний, обитающих в условиях крайне низкой освещенности больше, чем у колоний из зоны комфорта. Отмеченные изменения в морфологии колоний способствуют максимизации поглощения света (Титлянов и др., 1988в; Titlyanov et al., 2001а, 2001б).

Скорость темного дыхания кораллов *S. pistillata*, *P. damicornis* и *P. verrucosa*, адаптированных к освещенности $10\text{--}7\%$ ФАРп, в среднем была в $2\text{--}3$ раза ниже, чем адаптированных к освещенности 60% ФАРп (Titlyanov, 1981, 1991b; Титлянов и др., 1988в).

Плотность популяции зооксантелл в кораллах, перенесенных с освещенности 30% ФАРп в освещенность $5\text{--}0.1\%$ ФАРп, постепенно уменьшалась у всех исследованных кораллов. Например, у *S. pistillata* с 40×10^3 клеток на полип (при 30% ФАРп) она снизилась до 0.5×10^3 клеток на полип (при 0.8% ФАРп). Снижение плотности зооксантелл в теле полипа обусловлено снижением уровня деления симбиотических клеток и повышением скорости их деградации (Titlyanov et al., 2002).

В зоне экстремально низких показателей освещенности у полипов удваивалась активность хищничества, причем увеличивалась скорость обеих компонент – убийства и поедания жертвы. Стимуляция хищничества у кораллов проявля-

лась при освещенности ниже 30% ФАРп (Titlyanov et al., 2000б).

Рифостроящие кораллы выживают при экстремально низкой освещенности ($\leq 0.1\%$ ФАРп) в течение $90\text{--}120$ сут и в полной темноте в течение $30\text{--}40$ сут за счет хищничества и переваривания собственных зооксантелл. На 2-е сут пребывания в полной темноте резко снижается скорость деления зооксантелл и повышается скорость их переваривания. На 10-е сут темноты переваривается уже более 20% зооксантелл в сутки. На $30\text{--}40$ -е сут пребывания кораллов в темноте их ткани отмирают и отделяются от скелета. В отмирающей ткани полипов присутствуют зооксантеллы увеличенного размера, содержащие фотосинтетические пигменты, способные к делению и не имеющие признаков деградации. Если полип, длительное время находившийся при экстремально низкой освещенности или в полной темноте и содержащий несколько сотен или даже десятков зооксантелл, выставить на свет, то через $2\text{--}3$ мес полностью восстановится плотность популяции симбионтов, соответствующая новой освещенности в месте обитания.

Адаптация кораллов к яркому свету ($\geq 70\%$ ФАРп)

В процессе адаптации кораллов к яркому свету участвуют, по крайней мере, два механизма: оптимизация поглощения ФАР и комплекс светозащитных реакций. Морфология колоний *P. damicornis* и *P. verrucosa*, обитающих на ярком свету, способствует его максимальному поглощению всей поверхностью колоний. Масса и площадь поверхности колоний кораллов, обитающих на ярком свету (при 90% ФАРп), могут быть в 2 раза больше, чем колоний, обитающих на умеренном свету (30% ФАРп), как и количество ветвей последующих порядков на ветвях предыдущих порядков (Титлянов и др., 1988в). У некоторых видов ветвистых кораллов, обитавших на ярком свету, ветви последних порядков на поперечном срезе имели форму эллипса и были повернуты узкой стороной к падающему свету, что также максимизировало поглощение света колонией (Титлянов, 1987).

Симбионты неравномерно распределены по колонии коралла. Плотность популяции зооксантелл в колонии коралловых полипов зависит как от внешних, так и от внутренних факторов. Среди первых наибольшее значение имеет световой фактор, среди вторых – возраст полипов (Titlyanov, 1991а). Так, наибольшая плотность популяции зооксантелл в колонии ветвистого склерактиниевого коралла *P. verrucosa*, обитающего на глубине 1 м (90% ФАРп), отмечена в молодых ветвях третьего порядка. В то же время в колонии, взятой с этой же глубины, но из затененного места, плотность зооксантелл была наибольшей в ветвях первого порядка, а наименьшей – в ветвях второго порядка. Следует отметить, что в растущих верх-

них частях молодых ветвей коралла плотность популяции симбиотических клеток при любом режиме освещения была наименьшей (Titlyanov, 1991a).

В экспериментах снижение численности зооксантелл в кораллах на ярком свете происходило за счет уменьшения скорости деления зооксантелл и стимулирования их переваривания полипом. При переносе кораллов на яркий свет содержание хлорофиллов в расчете на единицу объема клетки симбионта снижалось в 1.5 раза в течение четырех суток (Титлянов и др., 1988в, 2002). В процессе адаптации коралла к яркому свету популяция зооксантелл обогащалась мелкими клетками светостойчивого типа "G", имеющими наименьшее количество хлорофилла, но наибольшую продуктивность (Titlyanov et al., 2001b; Титлянов и др., 2002).

Поглощение света фотосинтетическими пигментами регулируется также светозащитными реакциями организма кораллов. При свете высокой интенсивности в зооксантеллах увеличивается относительное содержание светозащитных пигментов: β-каротина, лютеина и некоторых других каротиноидов, которые способны принять электрон от возбужденного хлорофилла в триплетном состоянии, а также от активного кислорода в синглетном состоянии, защитив таким образом цепь передачи от избытка "возбужденных" электронов (Звалинский, 1988). Роль низкомолекулярных антиоксидантов в тканях полипа играют не только каротиноиды хлоропластов, но и некоторые из микоспорин-подобных аминокислот (Yakovleva, Hidaka, 2004; Yakovleva et al., 2004), а также высокомолекулярные антиоксиданты – ферменты супероксиддисмутаза, каталаза и аскорбат-глутатионпероксидаза (Yakovleva, Titlyanov, 2001; Yakovleva et al., 2009).

Таким образом, разнообразие существенных перестроек в структуре и функциях обеих компонент рифостроящих кораллов, находящихся в симбиотических взаимоотношениях под действием света как крайне низкой, так и высокой интенсивности, позволяет абсолютному большинству видов обитать в широком световом диапазоне и иметь стабильный уровень продукции.

ГЕТЕРОТРОФНОЕ ПИТАНИЕ КОРАЛЛОВ

Хищничество

За счет хищничества коралловые полипы получают в среднем от 10 до 40% пищи (Сорокин, 1990). Способы охоты кораллов многообразны: ловля и захват жертв щупальцами, поражение нематоцистами и последующий транспорт обездвиженных жертв ко рту с помощью слизевых тяжей, ловля подвижных жертв слизевыми сетями и др. Большинство кораллов наиболее активно питаются в ночное время и в ранние утренние часы (Сорокин, 1990; Titlyanov et al., 2000b). Наши экс-

перименты с кораллом *S. pistillata*, который охотился за науплиями артемии (*Artemia salina*), показали, что интенсивность добычи и переваривания науплиев зависит от количества света в месте обитания. Скорость убийства и переваривания науплиев была наибольшей на слабом свете (5–10% ФАРп) и составляла соответственно 2 и 1.5 науплия на один полип в 1 час, а наименьшей – на самом ярком свете (90% ФАРп), соответственно 1.5 и 0.7 науплия. При снижении интенсивности света в месте обитания увеличивалось отношение скорости переваривания жертвы к скорости ее добычи. Таким образом, снижение интенсивности света в месте обитания коралла стимулировало хищничество, особенно скорость переваривания пищи; кораллы, обитавшие в сильно затененных местах, активно охотились и ночью, и днем. На активность охоты и утилизацию добычи влияют и другие (кроме света) условия содержания кораллов. Так, при предварительном содержании фрагментов ветвей кораллов в условиях усиленного минерального питания соединениями азота и фосфора или животного питания на слабом свете их хищническая активность увеличивалась в 1.2–2.8 раза (Titlyanov et al., 2000a, 2000b).

Поглощение растворенных органических веществ животными клетками коралла

Источником пищи для кораллов, как и для других водных животных и растительных организмов, является органотрофия, т.е. поглощение и усвоение растворенных органических веществ из окружающей среды. Известно, что кораллы поглощают такие низкомолекулярные соединения, как сахара (глюкозу и рибозу), аминокислоты (глицин, аланин и глютаминовую кислоту), органические кислоты (яблочную и фумаровую) (Goreau et al., 1971; Титлянов и др., 1988в). Показано, что за счет поглощенных РОВ кораллы могут компенсировать около 10% своих суммарных энергетических потребностей (Сорокин, 1990).

В наших экспериментах была определена радиоактивность фрагментов колоний коралла *P. damicornis* после выдерживания их на свету или в темноте в течение 30 мин в растворах низкомолекулярных соединений, меченных радиоактивным углеродом (Титлянов и др., 1988в). Установлено, что относительная радиоактивность образцов, выдержанных в растворах радиоактивных веществ, была следующей: с аланином – 100% (15 тыс. импульсов в 1 мин/см² высушенного образца), с яблочной кислотой – 43%, с фумаровой кислотой – 36%, с глутаминовой кислотой – 20%, с глюкозой – 16% и с рибозой – 13%. Все испытанные соединения на свету поглощались на 20–30% лучше, чем в темноте. В экспериментах по изучению распределения гетеротрофного и фотогетеротрофного (на свету) поглощения РОВ различными частями колоний кораллов использовали аланин как вещество, наиболее ассимилируемое кораллом. Ока-

залось, что наибольшей способностью поглощать аланин и на свету, и в темноте обладали внешние наиболее молодые ветви кораллов, содержащиеся при умеренном затенении (10–30% ФАРп).

Поглощение из воды взвешенных частиц животного происхождения

Все склерактиниевые кораллы способны к фильтрационно-седиментационному питанию (Сорокин, 1979, 1990). Отфильтровывая из воды бактерии, фитопланктон, останки животных и растений, а также детрит и неорганические соединения, полипы утилизируют только бактерии и остатки животного происхождения (McCloskey, Chester, 1971). Принято считать, что остатки растительного происхождения кораллы не переваривают (Yonge, 1930a, 1930b, 1973).

В экспериментах по питанию мы кормили коралловые полипы *S. pistillata* коловраткой *Branchionus plicatilis*, которая перед экспериментом питалась зеленой водорослью хлореллой. Было отмечено, что полипы переваривали коловратку и не переваривали хлореллу, находящуюся в ней (Titlyanov et al., 2000b, 2001d). По расчетам Сорокина (1979), питание бактериопланктоном, составляющим основную часть пищевых частиц, обеспечивает не более 10% суммарных энергетических потребностей коралловых полипов, однако эта величина во многом видоспецифична.

Внутриклеточное переваривание водорослей-симбионтов

Клетки зооксантелл кораллов *Porites cylindrica*, *S. caliendrum* и *S. pistillata* на разных стадиях деградации встречались во всех органах полипа. На первой стадии деградации в клетках появлялись мелкие вакуоли, и цвет клеток изменялся с оливкового на коричневый. В дальнейшем клеточные стенки водорослей частично разрушались, хлоропласт сжимался, на поверхности клетки появлялись светлые капли. На последней стадии деградации зооксантеллы светлели, приобретали оранжевый цвет и теряли сферическую форму, превращаясь в бесформенные комочки. На электронных фотографиях деградированных зооксантелл можно видеть “аккумулятивное тело”, беспорядочно лежащие тилакоиды хлоропластов, глобулы крахмала и остатки крахмального покрытия пиреноидов. Ядро, пиреноид и липидные капли в остатках зооксантелл отсутствуют (рис. 4). Кроме этого, в полупереваренных клетках не найдено хлорофилла *c*, а количество хлорофилла *a* сократилось в два раза. Деградация зооксантелл происходит, как правило, в ночное время с максимальной интенсивностью между 0 и 3-мя часами. Вероятно, за внутриклеточное переваривание зооксантелл отвечают лизосомы (Colley, Trench, 1985). Полип в первую очередь переваривает вещества, богатые азотом и фосфором, это ДНК ядра и белок пире-

ноидов. Полисахариды зооксантелл остаются нетронутыми и выбрасываются полипом через глотку вместе с остатками мембран тилакоидов, аккумулятивным телом и другими непереваженными остатками в виде отдельных частиц или агрегатов разной величины (от сотен до нескольких тысяч деградированных клеток) (Titlyanov et al., 1996).

Обнаружены и описаны три типа ритмических изменений деградации зооксантелл. Первый тип изменений, отмеченный у *S. caliendrum* и у гидрокоралла *M. intricata*, представлял собой суточные колебания интенсивности процесса с максимумом в ночное время. Второй тип ритмических изменений имел период в 3 сут, а третий – в 5–6 сут. Наивысшая плотность деградированных зооксантелл была определена около 24:00 ч в покрывающей ткани и около 03:00 ч – в щупальцах и мезентерии. Доля зооксантелл, переваренных за сутки, варьировала от 1.1 до 7.6% от их общего количества. Процесс стимулировался гетеротрофным голоданием и сменой светового режима с умеренного затенения на яркий свет или на экстремально низкую освещенность (Titlyanov et al., 1996).

ГОЛОДАНИЕ КОРАЛЛОВ

Гетеротрофное голодание

Влияние усиленного питания и голодания на продукционную функцию зооксантелл было изучено на фрагментах колоний коралла *S. pistillata* при адаптации к сильному (90% ФАРп), умеренному (20%) и слабому (3%) свету, а также при выживании фрагментов кораллов в полной темноте. В аквариальных экспериментах коралловые полипы подкармливали коловраткой *Branchionus plicatilis* (см.: Titlyanov et al., 2001b, 2001d) и науплиями *Artemia salina* (см.: Titlyanov et al., 2000a). Усиленное питание коловратками и науплиями стимулировало все описанные нами ранее реакции адаптации к свету, но не помогло полипам выжить в полной темноте.

При отсутствии хищничества (выдерживание в отфильтрованной воде) полипы не смогли адаптироваться к новому световому режиму. Во всех вариантах опытов в полипах *S. pistillata* уменьшалась плотность популяции зооксантелл, при этом снижался уровень пролиферации и повышался уровень деградации зооксантелл. Скорость валового фотосинтеза клеток в расчете на один полип падала, а в расчете на одну зооксантеллу почти не изменялась; количество хлорофиллов в расчете на объем клетки симбионта также не изменялось. Скорость темного дыхания при обоих способах расчета изменялась незначительно.

ОСМОТИЧЕСКИЙ ШОК

Как показано выше, склерактиниевые кораллы выбрасывали не только остатки переваренных зооксантелл, но и живые клетки. В эксперимен-

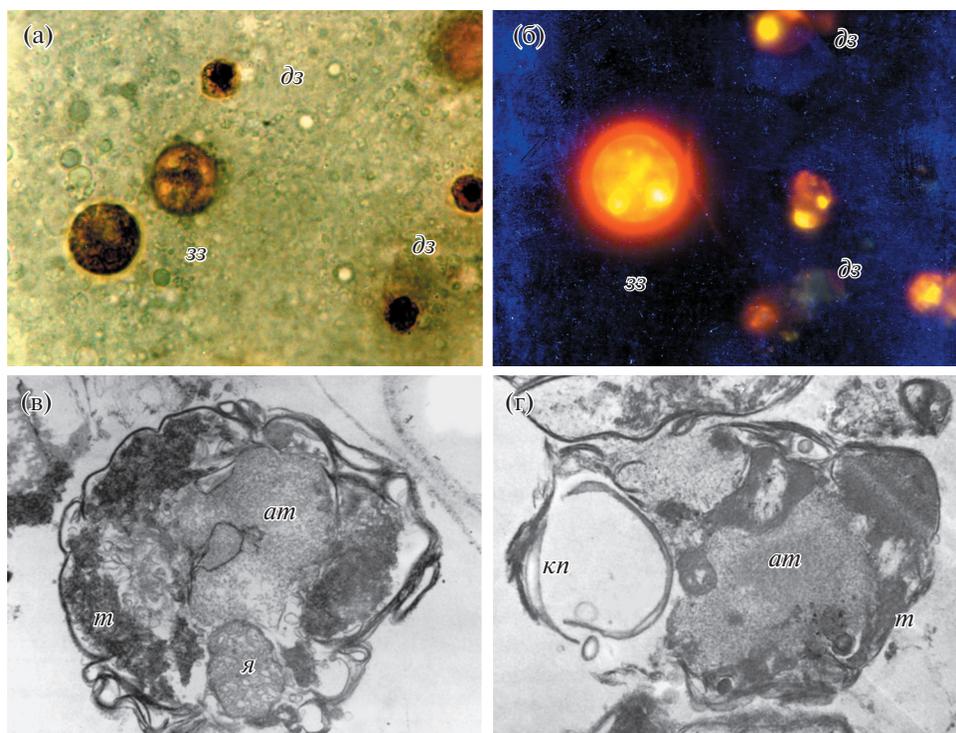


Рис. 4. Здоровые и деградированные зооксантеллы коралла *Stylophora pistillata*. а – зооксантеллы под микроскопом в видимом свете; б – зооксантеллы под микроскопом в ультрафиолетовом свете; в – деградирующая клетка зооксантеллы; г – остаток от зооксантеллы. Условные обозначения: 33 – здоровые зооксантеллы, дз – деградирующие зооксантеллы, т – тилакоиды, кп – крахмал пиреноида.

тах с фрагментами колоний коралла *S. pistillata*, выдержанных в аквариумах с добавками животной пищи и при гетеротрофном голодании (фильтрованная морская вода), была рассчитана скорость выброса живых зооксантелл, которая на 15-е сут выдерживания в обоих вариантах опыта составляла 5–7 экз./сут на один полип. В то же время скорость выброса полупереваренных клеток у полипов в варианте с пищевой подкормкой составляла около 3×10^3 кл./сут на один полип, а в варианте с гетеротрофным голоданием – 15×10^3 кл./сут.

На 18-е сут эксперимента с голодающими полипами фрагменты коралла были подвержены осмотическому шоку – опреснению воды в аквариумах с 34 до 17 PSU. Через 12 ч выдерживания кораллов в этих условиях каждый полип потерял в среднем 3–4 тыс. живых клеток зооксантелл. За это время кораллы выбросили приблизительно столько же полупереваренных клеток. Через 3 сут после шока у коралловых полипов уровень выброса как деградированных, так и здоровых зооксантелл восстановился. Таким образом, было показано, что массовый выброс живых зооксантелл из тканей коралла происходит только в стрессовых ситуациях и не является механизмом регуляции плотности симбионтов в ткани полипа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем обзоре обсуждаются результаты экспериментальных полевых и лабораторных работ авторов и их коллег по экологии, физиологии, биофизике и биохимии рифостроящих кораллов, объединенные идеей поиска и изучения связей между животным (коралловым полипом) и его внутриклеточными симбионтами (водорослями динофлагеллятами). Показаны тесные мутуалистические связи между коралловыми полипами и их симбионтами микроводорослями-зооксантеллами в едином организме – колонии коралловых полипов. Жизненной стратегией микроводорослей-зооксантелл является автотрофное существование в клетках ткани животного в виде цист за счет использования в процессе фотосинтеза углекислоты, выделяемой хозяином при дыхании, и его богатых биогенными элементами метаболитов. Максимальной и эффективной работе фотосинтетического аппарата зооксантелл способствуют использование животным продуктов фотосинтеза, а также регулирование им количества и качества поступающей пищи.

На основе полученных результатов и литературных данных предполагаются следующие основные механизмы, регулирующие фотосинтетическую функцию зооксантелл и поступление продуктов фотосинтеза в клетки животного. (1)

Регулирование плотности популяции зооксантелл путем изменения скорости их деления и дегенерации в процессе адаптации кораллов к определенному количеству света; стимулирование деления зооксантелл подачей биогенных элементов (N и P) и воздействием “хост фактора”; повышение или снижение интенсивности дегенерации (переваривания) зооксантелл. (2) Регулирование количества поглощенного колонией света путем изменения морфологии скелета в процессе адаптации к свету в месте обитания, а также мягких тканей коралла в зависимости от действующего света. (3) Стимулирование или ингибирование продукционной функции зооксантелл “хост фактором”. (4) Изменение способности животной клетки использовать продукты фотосинтеза зооксантелл через увеличение или уменьшение гетеротрофного питания, в том числе переваривания собственных зооксантелл.

Доступность продуктов автотрофного и гетеротрофного питания кораллов позволяет им обитать почти во всем световом диапазоне фотической зоны шельфа, длительное время выживать в условиях автотрофного или гетеротрофного голодания, переживать стрессовые ситуации, а также полностью восстанавливаться после негативных воздействий.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Биль К.Я., Колмаков П.В., Пярник Т.Р. и др. Продукты фотосинтеза зооксантелл симбиотических кораллов *Stylophora pistillata* и *Seriatopora colindrum*, обитающих на разных глубинах // Физиол. раст. 1991. Т. 38. № 5. С. 846–854.
- Звалинский В.И. Световая зависимость фотосинтеза зооксантелл в непрерывном и импульсном свете // Биология коралловых рифов. Фотосинтез зооксантелл и водорослей макрофитов. Владивосток: ДВО АН СССР. 1988. С. 100–111.
- Звалинский В.И., Титлянов Э.А., Лелеткин В.А., Новожилов А.В. Адаптация кораллов к свету // Биология коралловых рифов. Фотосинтез зооксантелл и водорослей макрофитов. Владивосток: ДВО АН СССР. 1978. С. 29–52.
- Лелеткин В.А., Звалинский В.И., Титлянов Э.А. Фотосинтез зооксантелл кораллов разных глубин // Физиол. раст. 1980. Т. 27. № 6. С. 1163–1171.
- Литтлер М.М., Литтлер Д.С., Титлянов Э.А. Основные автотрофные продуценты органического вещества на тропических рифах и условия доминирования некоторых из них // Биол. моря. 1991. № 6. С. 3–14.
- Машанский В.Ф., Ли С.Е., Титлянов Э.А., Преображенский В.Б. Морфофункциональные корреляции ультраструктуры кальциферных клеток кораллов в зависимости от освещенности // Биол. моря. 1979. № 4. С. 80–82.
- Сорокин Ю.И. Экспериментальное исследование гетеротрофного питания массовых видов кораллов-строителей // ДАН СССР. 1979. Т. 249. С. 509–512.
- Сорокин Ю.И. Экосистемы коралловых рифов. М.: Наука. 1990. 503 с.
- Титлянов Э.А. Морфологические различия колоний рифообразующих ветвистых кораллов, обитающих в различных световых режимах // Биол. моря. 1987. № 1. С. 32–36.
- Титлянов Э.А. Зооксантеллы в герматипных кораллах: жизненная стратегия. Владивосток: Дальнаука. 1999. 63 с.
- Титлянов Э.А., Звалинский В.И., Лелеткин В.А. Некоторые механизмы адаптации зооксантелл кораллов к свету // Докл. Акад. Наук СССР. 1978. Т. 238. № 5. С. 1231–1234.
- Титлянов Э.А., Звалинский В.И., Лелеткин В.А., Шапошникова М.Г. Фотосинтез зооксантелл рифостроящих кораллов в разных условиях освещения // Биология коралловых рифов. Исследования на банке Фантом (Тиморское море). Владивосток. 1983. С. 51–74.
- Титлянов Э.А., Звалинский В.И., Шапошникова М.Г., Лелеткин В.А. Некоторые механизмы адаптации рифообразующих кораллов Австралии к интенсивности света // Биол. моря. 1981. № 2. С. 22–31.
- Титлянов Э.А., Колмаков П.В., Хиёу Л.Н. Структура и продукционная функция колоний кораллов рода *Pocillopora* в пределах светового диапазона их обитания // Биология коралловых рифов. Владивосток: ДВО АН СССР. 1988в. С. 52–71.
- Титлянов Э.А., Латыпов Ю.Я., Ермак В.Д. Влияние света на распределение склерактиний в сублиторали островов Антхой, Тхотю (Сиамский залив) и Кондао (Южно-Китайское море) // Биология коралловых рифов. Владивосток: ДВО АН СССР. 1988б. С. 5–18.
- Титлянов Э.А., Магомедов И.М., Колмаков П.В., Буторин П.В. Адаптация к свету, первичная продукция ее использование у массовых видов рифостроящих кораллов Индо-Пацифики // Биология коралловых рифов. Владивосток: ДВО АН СССР. 1988а. С. 19–45.
- Титлянов Э.А., Лелеткин В.А., Ермак В.Д., Воскобойников Г.М. Адаптация массовых видов рифостроящих кораллов к разной освещенности // Биол. моря. 1990. № 1. С. 30–37.
- Титлянов Э.А., Титлянова Т.В. Рифостроящие кораллы – симбиотические автотрофные организмы. 1. Общие черты строения, способы питания, светозависимое распределение на шельфе // Биол. моря. 2002а. Т. 28. № 4. С. 239–253.
- Титлянов Э.А., Титлянова Т.В. Рифостроящие кораллы – симбиотические автотрофные организмы. 2. Пути и механизмы адаптации к свету // Биол. моря. 2002б. Т. 28. № 5. С. 319–333.
- Титлянов Э.А., Титлянова Т.В., ван Воевик Р., Ямазато К. Адаптация герматипного коралла *Stylophora pistillata*

- к яркому свету // Биол. моря. 2002. Т. 28. № 6. С. 436–441.
- Титлянов Э.А., Титлянова Т.В., Яковлева И.М., Калинта Т.Л. Ритмические изменения в процессах деления и деградации симбиотических водорослей герматипных кораллов // Биол. моря. 2006. Т. 32. № 1. С. 17–25.
- Barnes D.J., Taylor D.L. In situ studies of calcification and photosynthetic carbon fixation in the coral *Montastrea annularis* // Helgol. Wiss. Meeresunters. 1973. V. 24. P. 284–291.
- Bil' K.Y., Kolmakov P.V., Muscatine L. Chapter 13: Photosynthetic products of zooxanthellae of the reef-building corals *Stylophora pistillata* and *Seriatopora caliendrum* from different depths of the Seychelles Islands // Atoll Res. Bull. 1992. № 377. P. 1–8.
- Blanquet R.S., Nevenzel J.C., Benson A.A. Acetate incorporation into the lipids of the anemone *Anthopleura elegantissima* and its associated zooxanthellae // Mar. Biol. 1979. V. 54. № 2. P. 185–194.
- Colley N.J., Trench R.K. Cellular events in the reestablishment of a symbiosis between a marine dinoflagellate and coelenterate // Cell Tissue Res. 1985. V. 239. P. 93–103.
- Crossland C.J., Hatcher B.G., Smith S.V. Role of coral reefs in global ocean production // Coral Reefs. 1991. V. 10. P. 55–64.
- Dustan P. Distribution of zooxanthellae and photosynthetic chloroplast pigments of the reef-building coral *Montastrea annularis* Ellis and Solanders in relation to depth on a West Indian coral reef // Bull. Mar. Sci. 1979. V. 29. № 1. P. 79–85.
- Eden N., Fomina I., Bil K. et al. Photosynthetic capacity and composition of ^{14}C fixation products in symbiotic zooxanthellae of *Stylophora pistillata* in vivo under different light and nutrient conditions // Proc. VI Int. Conf. "Preservation of Our World in the Wake of Change" / Ed. Y. Steinberger. Jerusalem, Israel: Israel Soc. Ecol. Environ. Qual. Sci. 1996. V. 6A/B. P. 462–463.
- Fong P., Paul V.J. Coral reef algae // Coral Reefs: An Ecosystem in Transition / Eds. Z. Dubinsky, N. Stambler. Dordrecht, the Netherlands: Springer-Verlag. 2011. P. 241–272.
- Goreau T.F., Goreau N.I., Yonge C.M. Reef corals: autotrophs or heterotrophs? // Biol. Bull. 1971. V. 141. № 2. P. 247–260.
- Graus R.R., Macintyre I.G. Light control of growth form in colonial reef corals: computer simulation // Science. 1976. V. 193. № 4256. P. 895–897.
- Graus R.R., Macintyre I.G. Variation in growth forms of the reef coral *Montastrea annularis* (Ellis and Solander): A quantitative evaluation of growth response to light distribution using computer simulation // The Atlantic Barrier Reef Ecosystem at Carrie Bow Cay, Belize. I. Structure and Communities / Eds. K. Rützler, I.G. Macintyre. Smithsonian Contribution to Marine Sciences. Washington, DC: Smithsonian Inst. 1982. V. 12. P. 441–464.
- Harrison P.L. Sexual reproduction of scleractinian corals // Coral Reefs: An Ecosystem in Transition / Eds. Z. Dubinsky, N. Stambler. Dordrecht, the Netherlands: Springer-Verlag. 2011. P. 59–87.
- Leletkin V.A., Titlyanov E.A., Dubinsky Z. Photosynthesis and respiration of the zooxanthellae in hermatypic corals habitated on different depths of the Gulf of Eilat // Photosynthetica. 1996. V. 32. № 4. P. 481–490.
- Leletkin V.A., Titlyanov E.A., Yamazato Y., Kamosawa M. Morpho-functional characteristics of some common branching corals from light an shade habitats on Sesoko Island (Okinawa, Japan) // Asian Mar. Biol. 1999. V. 16. P. 13–22.
- Loh W., Hidaka M., Hirose M., Titlyanov E.A. Genotypic diversity of symbiotic dinoflagellates associated with hermatypic corals from a fringing reef at Sesoko Island, Okinawa // Galaxea. 2002. V. 2002. № 4. P. 1–9.
- Lüning K. Seaweeds: Their Environment, Biogeography and Ecophysiology; Hoboken, NJ: Wiley. 1990. 527 p.
- Malkin A., Dubinsky Z., Titlyanov E. et al. Composition and translocation of symbiotic algae photosynthates at different nutritions in presence of host factor // Proc. VI Int. Conf. "Preservation of Our World in the Wake of Change" / Ed. Y. Steinberger. Jerusalem, Israel: Israel Soc. Ecol. Environ. Qual. Sci. 1996. V. 6A/B. P. 459–461.
- McCloskey L.R., Chester R.H. Effects of man-made pollution on the dynamics of coral reefs // Tektite 2: Scientists in the Sea / Eds. J.W. Miller, J.G. van Derwalker, R.A. Waller. Washington, DC: U. S. Dep. of the Interior. 1971. Pt. 4. P. 229–238.
- Muscatine L. Glycerol excretion by symbiotic algae from corals and *Tridacna* and its control by the host // Science. 1967. V. 156. P. 516–519.
- Muscatine L. The role of symbiotic algae in carbon and energy flux in reef corals // Ecosystems of the World: Coral reefs / Ed. Z. Dubinsky. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier. 1990. P. 75–87.
- Muscatine L., Cernichiari E. Assimilation of photosynthetic products of zooxanthellae by a reef coral // Biol. Bull. 1969. V. 137. № 3. P. 506–523.
- Muscatine L., Falkowski P.G., Dubinsky Z. Carbon budgets in symbiotic associations // Endocytobiology II: Intracellular Space as Oligogenetic Ecosystem / Eds. W. Schwemmler, H.E.A. Schenk. Berlin: W. de Gruyter. 1983. V. 2. P. 649–658.
- Patton J.S., Abraham S., Benson A.A. Lipogenesis in the intact coral *Pocillopora capitata* and its isolated zooxanthellae: evidence for a light-driven carbon cycle between symbiont and host // Mar. Biol. 1977. V. 44. № 3. P. 235–247.
- Stambler N. Zooxanthellae: The yellow symbionts inside animals // Coral Reefs: An Ecosystem in Transition / Eds. Z. Dubinsky, N. Stambler. Dordrecht, the Netherlands: Springer-Verlag. 2011. P. 87–106.
- Titlyanov E.A. Adaptation of reef-building corals to low light intensity // Proc. 4th Coral Reef Symp. Manila, Philippines: Univ. of Philippines. 1981. V. 2. P. 39–43.
- Titlyanov E.A. Light adaptation and production characteristics of branches differing by age and illumination of the hermatypic coral *Pocillopora verrucosa* // Symbiosis. 1991a. V. 10. P. 249–260.
- Titlyanov E.A. The stable level of coral primary production in a wide light range // Hydrobiologia. 1991b. V. 216. P. 383–387.
- Titlyanov E.A., Latypov Y.Y. Light-dependence in scleractinian distribution in the sublittoral zone of South China Sea Islands // Coral Reefs. 1991. V. 10. P. 133–138.
- Titlyanov E.A., Bil' K., Fomina I. et al. Effects of dissolved ammonium addition and host feeding with *Artemia salina* on photoacclimation of the hermatypic coral *Stylophora pistillata* // Mar. Biol. 2000a. V. 137. P. 463–472.
- Titlyanov E.A., Leletkin V.A., Dubinsky Z. Autotrophy and predation in the hermatypic coral *Stylophora pistillata*

- in different light habitats // *Symbiosis*. 2000b. V. 29. P. 263–281.
- Titlyanov E.A., Shaposhnikova M.G., Zvalinsky V.I. Photosynthesis and adaptation of corals to irradiance. 1. Contents and native state of photosynthetic pigments in symbiotic microalgae // *Photosynthetica*. 1980. V. 14. № 3. P. 413–421.
- Titlyanov E.A., Titlyanova T.V., Yamazato K. Formation, growth and photo-acclimation of colonies of the hermatypic coral *Galaxea fascicularis* under different light conditions // *Symbiosis*. 2001a. V. 30. P. 257–274.
- Titlyanov E.A., Titlyanova T.V., Yamazato K. Acclimation of symbiotic reef-building corals to extremely low light // *Symbiosis*. 2002. V. 33. P. 125–143.
- Titlyanov E.A., Titlyanova T.V., Leletkin V.A. et al. Degradation of zooxanthellae and regulation of their density in hermatypic corals // *Mar. Ecol.: Prog. Ser.* 1996. V. 139. P. 167–178.
- Titlyanov E.A., Titlyanova T.V., Loya Y., Yamazato K. Degradation and proliferation of zooxanthellae in planulae of the hermatypic coral *Stylophora pistillata* // *Mar. Biol.* 1998. V. 130. P. 471–477.
- Titlyanov E.A., Titlyanova T.V., Tsukahara J. et al. Experimental increases of zooxanthellae density in the coral *Stylophora pistillata* elucidate adaptive mechanisms for zooxanthellae regulation // *Symbiosis*. 1999. V. 26. P. 347–362.
- Titlyanov E.A., Titlyanova T.V., Amat A., Yamazato K. Morphophysiological variations of symbiotic dinoflagellates in hermatypic corals from a fringing reef at Sesoko Island // *Galaxea*. 2001b. V. 2001. № 3. P. 51–63.
- Titlyanov E.A., Titlyanova T.V., Yamazato K., Van Woesik R. Photo-acclimation dynamics of the coral *Sylophora pistillata* to low and extremely low light // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2001c. V. 263. P. 211–225.
- Titlyanov E.A., Titlyanova T.V., Yamazato K., Van Woesik R. Photo-acclimation of the hermatypic coral *Sylophora pistillata* while subjected to either starvation or food provisioning // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2001d. V. 257. P. 163–181.
- Titlyanov E.A., Tsukahara J., Titlyanova T.V. et al. Zooxanthellae population density and physiological state of the coral *Stylophora pistillata* during starvation and osmotic shock // *Symbiosis*. 2000b. V. 28. P. 303–322.
- Vareschi E., Fricke H. Light responses of scleractinian coral (*Plerogyra sinuosa*) // *Mar. Biol.* 1986. V. 90. № 3. P. 395–402.
- Veron J.E.N. Corals of Australia and the Indo-Pacific. North Ryde, NSW, Australia: Angus & Robertson. 1986. 644 p.
- Yakovleva I., Hidaka M. Diel fluctuations of mycosporine-like amino acids in shallow-water scleractinian corals // *Mar. Biol.* 2004. V. 145. № 5. P. 863–873.
- Yakovleva I.M., Titlyanov E.A. Effect of high visible and UV irradiance on subtidal *Chondrus crispus*: stress, photoinhibition and protective mechanisms // *Aquat. Bot.* 2001. V. 71. P. 47–61.
- Yakovleva I., Bhagooli R., Takemura A., Hidaka M. Differential susceptibility to oxidative stress of two scleractinian corals: antioxidant functioning of mycosporine-glycine // *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* 2004. V. 139. P. 721–730.
- Yakovleva I.M., Baird A.H., Yamamoto H.H. et al. Algal symbionts increase oxidative damage and death in coral larvae at high temperatures // *Mar. Ecol.: Prog. Ser.* 2009. V. 378. P. 105–112.
- Yonge C.M. Studies on the physiology of corals. I. Feeding mechanisms and food // *Great Barrier Reef Expeditions 1928–29: Scientific Reports*. London: Br. Mus. Nat. Hist. 1930a. V. 1. № 2. P. 13–37.
- Yonge C.M. Food assimilation and excretion in corals // *Great Barrier Reef Expeditions 1928–29: Scientific Reports*. London: Br. Mus. Nat. Hist. 1930b. V. 1. P. 14–57.
- Yonge C.M. The nature of hermatypic reef-building corals // *Bull. Mar. Sci.* 1973. V. 23. P. 1–15.
- Zhukova N.V., Titlyanov E.A. Fatty acid variations in symbiotic dinoflagellates from Okinawan corals // *Phytochemistry*. 2003. V. 62. P. 191–195.
- Zhukova N.V., Titlyanov E.A. Effect of light intensity on the fatty acid composition of dinoflagellates symbiotic with hermatypic corals // *Bot. Mar.* 2006. V. 49. P. 339–346.

Symbiotic Relationships between Microalgal Zooxanthellae and Reef-Building Coral Polyps in the Process of Autotrophic and Heterotrophic Nutrition

E. A. Titlyanov^a and T. V. Titlyanova^a

^aA.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

The present review briefly summarizes the results of the studies on coral reefs of the Indo-Pacific conducted by the authors and their colleagues who participated in joint publications and research since the late 1970s until recent times. Experimental field and laboratory-based works were carried out during the expeditions aboard the R/V *Kallisto* and R/V *Akademik Aleksandr Nesmeyanov*, as well as at the marine biological stations in Japan, China, Vietnam, and Israel. The main goal of these studies was to obtain data on the variety and mechanisms of symbiotic relationships that are established between a host animal and its intracellular symbionts when the former organism carries out its most important life functions.

Keywords: reef-building corals, zooxanthellae, symbiotic relationships

УДК 595.384

РЕПРОДУКТИВНАЯ СТРАТЕГИЯ РАКОВ-ОТШЕЛЬНИКОВ УМЕРЕННЫХ ШИРОТ

© 2020 г. Е. С. Корниенко*

Национальный научный центр морской биологии (ННЦМБ) им. А.В. Жирмунского ДВО РАН,
Владивосток 690041, Россия

*e-mail: kornielena@mail.ru

Поступила в редакцию 27.01.2020 г.

После доработки 25.03.2020 г.

Принята к публикации 27.03.2020 г.

В обзоре проанализированы основные характеристики репродуктивной стратегии раков-отшельников: соотношение полов, возраст (размер) наступления половозрелости, плодовитость и длительность инкубационного периода, а также оценена их зависимость от наличия и качества доступных раковин гастропод. Обсуждаются широтные вариации репродуктивных характеристик и особенности размножения прибрежных раков-отшельников умеренных широт.

Ключевые слова: Paguroidea, соотношение полов, возраст половозрелости, плодовитость, инкубационный период, эмбриональная диапауза

DOI: 10.31857/S0134347520050058

Жизненный цикл вида зачастую зависит от стратегии размножения, которая определяет динамику численности, возрастной состав популяции и соотношение полов. Репродуктивная стратегия отражается на видовых характеристиках, таких как ареал вида и длительность его жизни (Касьянов, 1989). В умеренных широтах морским организмам свойственна сезонность размножения в соответствии с циклическим характером температуры воды и продолжительности светового дня. Считается, что это позволяет синхронизировать пик выхода личинок с периодом наибольшей доступности пищи в пелагической среде (Anger, 2001).

Термин “стратегия” описывает запрограммированный набор характеристик поведения или цикла развития. Традиционно жизненные циклы разделяют на две группы: r-стратегия (ранний возраст половозрелости, большое количество потомства, отсутствие родительской заботы, большое репродуктивное усилие) и K-стратегия (отсроченное половое созревание, небольшое число потомков, родительская забота, небольшое репродуктивное усилие). Стратегия каждого вида — компромисс между этими двумя крайними вариантами (Pianka, 1970; Пианка, 1981).

Отличительной чертой декапод подотряда Pleocyemata, к которому относятся и раки-отшельники (Anomura, Paguroidea), является забота о потомстве; их самки вынашивают яйца на плеоподах до вылупления личинок (обычно на стадии зоэа). У некоторых видов потомство находится

под плеоном самки до достижения ювенильной стадии (Thiel, 2003; Bolaños et al., 2004; Vogt, Tolley, 2004; Huguet et al., 2011; Rodríguez, Cuesta, 2011; Vogt, 2013). Среди раков-отшельников расширенная забота о потомстве известна только у одного представителя рода *Calcinus*, для которого характерны небольшое количество яиц в кладке и сокращенное развитие. Выйдя из яйцевых оболочек на поздней стадии зоэа, личинки рака-отшельника остаются в материнской раковине, личинка сначала в мегалопу, затем в первую ювенильную стадию, и только после этого покидают раковину (Calado et al., 2006).

Основная особенность морфологии раков-отшельников — мягкий некальцинированный брюшной отдел, для защиты которого Paguroidea обычно используют пустые раковины брюхоногих моллюсков. Представители некоторых видов поселяются в раковинах двустворчатых и лопатоногих моллюсков; известны виды, живущие в прикрепленных раковинах гастропод-верметид или в известковых трубках полихет (Williams, McDermott, 2004). Раки-отшельники — это животные-эдификаторы: используя раковины гастропод, они изменяют среду обитания, а также влияют на обилие и распространение других беспозвоночных. Известно более 550 видов симбионтов, связанных приблизительно со 180 видами раков-отшельников (Williams, McDermott, 2004).

Paguroidea — довольно крупные представители макробентосных сообществ литорали и сублиторали, всеядные мусорщики, падальщики и детри-

тофаги, играющие заметную роль в морских пищевых цепях (Hazlett, 1981; Laidre, Greggor, 2015). Несмотря на сезонность присутствия, их личинки являются существенной частью планктона, которым питается молодь рыб. Взрослые особи служат пищей для птиц, донных рыб, осьминогов и морских звезд. К настоящему времени надсемейство Paguroidea включает более 1000 видов (McLaughlin et al., 2010). Раки-отшельники встречаются в самых разных местообитаниях от наземных до глубоководных, но подавляющее большинство — это морские виды (McLaughlin, 2003), которые распространены от субарктических (Gorny, 1999) до антарктических (Balazy et al., 2015) морей, достигая наибольшего видового разнообразия в тропических и субтропических регионах.

Раков-отшельников часто используют как объект для изучения поведенческих реакций (Gravel et al., 2004; Bullock, Dunbar, 2009, 2011; Buranelli et al., 2015; Yasuda, Koga, 2016, и др.), а также в качестве видов-индикаторов в экологических исследованиях (см., например: Steibl, Laforsch, 2019). Изучение жизненного цикла важно для сохранения биоразнообразия этой группы декапод. Популяции раков-отшельников страдают от антропогенного воздействия: они в массовом количестве погибают, попадая в прилов при тралении (Frameschi et al., 2015); практика выбрасывания прилова, мелких рыб и субпродуктов рыболовными судами приводит к увеличению популяций наиболее агрессивных конкурирующих за пищу видов раков-отшельников, при этом снижается обилие подчиненных видов (Kaiser et al., 1998); закисление океана влияет на количество и качество доступных раковин гастропод и является причиной повышенной смертности личинок раков-отшельников (Tomatsuri, Kon, 2019); многие виды раков-отшельников популярны в аквариумном бизнесе, для которого изымаются из естественной среды (Calado et al., 2003). Биоразнообразие раков-отшельников угрожают и виды-вселенцы, которые могут повлиять на местные виды, изменив структуру и функционирование экосистем. Например, инвазивный прибрежный краб *Hemigrapsus sanguineus* стал доминирующим видом на юго-восточных пляжах Массачусетса, потеснив нативные виды, среди которых раки-отшельники *Pagurus acadianis* и *P. longicarpus* (см.: Westgate, 2011).

Сезон размножения раков-отшельников, как и других ракообразных из инфраотряда Pleocymata, — это период, когда в популяции присутствуют самки с яйцами на плеоподах (яйценозные самки) (Reese, 1968). У представителей рода *Diogenes* (Diogenidae) и многих видов семейства Paguridae спариванию предшествует прекопулятивное поведение самцов: малой клешней они захватывают край раковины самки и удерживают ее в течение некоторого времени до копуляции, а иногда и после (Imafuku, 1986; Wada et al., 1996; Goshima et al., 1998; Asakura, 2009). Во время уха-

живания самец помещает сперматофоры внутрь раковины на поверхность тела самки. Спустя несколько часов после получения сперматофоров самка откладывает яйца (Hess, Bauer, 2002; Conteras-Garduño, Córdoba-Aguilar, 2006). Время появления прекопулятивных пар позволяет определить начало сезона размножения. Продолжительность сезона размножения — один из аспектов репродуктивной стратегии вида; она зависит от длительности инкубационного периода и от количества кладок, которые самка вынашивает в течение сезона. Соотношение полов, плодовитость и возраст наступления половозрелости также характеризуют репродуктивную биологию вида.

Для изучения репродуктивных стратегий морских беспозвоночных важны данные о биологии личинок: типе развития, способе питания и длительности пелагической стадии (Thorson, 1950; Милейковский, 1985; Касьянов, 1989). У раков-отшельников, как и у других бентосных декапод, личинки и конспецифичные взрослые значительно различаются по морфологии, способам питания и передвижения. Пелагическая личинка раков-отшельников (зоэа) активно плавает, используя приспособленные для этого грудные придатки, а питается с помощью ротовых придатков, утративших плавательную функцию (Anger, 2006), и в процессе развития претерпевает несколько линек в соответствии с количеством стадий. Долгое время зоэа рассматривали как расселительную стадию. Однако в настоящее время известно, что личинки декапод могут удерживаться вблизи родительской популяции с помощью пассивных или активных средств, препятствующих их переносу из первоначальной среды обитания (Gherardi, 1995; Tamaki et al., 2010). Пелагическая фаза жизни раков-отшельников семейства Paguridae обычно представлена четырьмя (редко тремя) стадиями зоэа, у Paguridae количество стадий может достигать шести, у представителей Diogenidae развитие бывает сокращенным до двух стадий зоэа (Tudge et al., 2012). Оседание происходит на стадии мегалопы, которая по морфологии, экологии и поведению сходна с ювенильными и взрослыми особями. При оседании мегалопа ползает по дну, используя переоподы, но сохраняет способность к плаванию с помощью плеоподов.

Для раков-отшельников мощным фактором, определяющим динамику популяции, является ресурс раковин. Размер, вид, масса раковин и наличие на них эпибионтов могут влиять на разные аспекты жизненного цикла рака-отшельника, в том числе и на его репродуктивные характеристики (Fotheringham, 1976, 1980; Bertness, 1981; Hazlett, 1981; Elwood et al., 1995; Turra, Leite, 2003). Потребность в раковине впервые возникает при оседании личинок (Asakura, 1991; Harvey, Colasurdo, 1993; Oba, Goshima, 2004). Предполагается, что конкуренция между мегалопами, которые впервые приобретают раковину, может быть более на-

пряженной, чем между взрослыми раками-отшельниками, имеющими раковину.

Цель настоящей работы — на основе анализа литературных данных о размножении раков-отшельников умеренных широт выявить особенности их репродуктивной стратегии, обусловленные влиянием ограниченного ресурса подходящих раковин гастропод и воздействием климатических факторов, определяющих период, благоприятный для размножения.

Соотношение полов

Известно, что заметное отклонение соотношения полов от 1 : 1 широко распространено среди морских ракообразных. Одним из факторов, способствующих неравенству соотношения полов, является разная смертность самок и самцов. На соотношение полов в популяции могут также повлиять ограниченность питания, большая активность и переселение (эмиграция) одного из полов, использование разных мест обитания (Weniger, 1972). У прибрежных раков-отшельников, как и у многих других декапод, среди мелких особей обычно преобладают самки, а крупные особи представлены преимущественно самцами (Lancaster, 1990; Turra, Leite, 2000; Mishima, Henmi, 2008; Balazy et al., 2015). Энергетические затраты организма на рост и размножение у разных полов часто различаются, что приводит к появлению размерного полового диморфизма. Производство яиц — затратный процесс, в который самки вкладывают значительную часть энергии, в то время как самцы используют эту энергию для роста (Abrams, 1988). У многих прибрежных видов раков-отшельников самки начинают размножаться при небольших размерах в первый год жизни. Считается, что это позволяет в определенной степени снизить внутривидовую конкуренцию за раковины (Lancaster, 1990). Соотношение полов в разных размерных группах варьирует, но в целом оно может быть близким к 1 : 1, как, например, у *Pagurus proximus* (см.: Wada, Mima, 2003; Kornienko et al., 2019), *Discorsopagurus schmitti* (см.: Gherardi, Cassidy, 1995), *Anapagurus alboranensis* и *P. excavatus* (см.: Macpherson, Raventos, 2004). У некоторых видов преобладают самцы, как у *Loxopagurus loxochelis* (см.: Martinelli et al., 2002) и *P. brachiomastus* (см.: Корниенко, Селин, 2019). Однако чаще соотношение полов у раков-отшельников смещено в сторону преобладания самок, как у *P. minutus* (см.: Yasuda et al., 2017; Korn et al., 2018), *Anapagurus petiti* (см.: Macpherson, Raventos, 2004), *P. middendorffii* (см.: Wada et al., 1995), *P. lanuginosus* и *Clibanarius virescens* (см.: Imazu, Asakura, 1994). Соотношение полов может изменяться в зависимости от сезона. Так, в эстуарии р. Вака (Вакаяма, Япония) в популяции *P. minutus* в течение репродуктивного сезона, который длится с ноября по апрель, преобладали самки, с мая по июль соотношение полов было почти равным, а в августе

заметно преобладали самцы (Yasuda et al., 2017). В зал. Восток (Японское море) у *P. proximus* соотношение полов в целом было близко к 1, но в мае, когда все самки были яйценосными, самцов было в 4 раза меньше, чем самок. В июле—августе соотношение полов было почти равным, а в сентябре, когда сезон размножения завершался, преобладали самцы (Kornienko et al., 2019).

Возраст наступления половозрелости и плодовитость

Возраст (размер) наступления половозрелости раков-отшельников определяется риском смертности, связанной с использованием раковин разного размера. Маленькие раковины легко повреждаются и разрушаются хищниками, поэтому особи, обитающие в них, часто погибают. Ракам-отшельникам с небольшими размерами тела достичь репродуктивного успеха позволяют ранняя половозрелость и высокое репродуктивное усилие. У крупноразмерных раков-отшельников уровень смертности молоди, обитающей в небольших раковинах, также высок, но взрослые особи занимают большие крепкие раковины и более устойчивы по отношению к хищникам; для них характерны позднее созревание и низкий уровень репродуктивного усилия (Carlson, Ebersole, 1995). Предполагается, что при раннем созревании снижается внутривидовая конкуренция между полами за ресурс раковин: самки освобождаются от необходимости достижения определенного размера для размножения. Самцы этого же возраста в результате данной стратегии освобождаются от внутривидовой конкуренции за большие раковины, так как рост самок замедляется во время вынашивания яиц (Lancaster, 1990).

Оценка плодовитости, напрямую связанной с распределением энергии, играет главную роль в исследованиях жизненных циклов и в разработке их моделей. Существуют важные взаимосвязи и компромиссы между плодовитостью и такими жизненными характеристиками, как размер яйца, размер и возраст самки, возраст при первом размножении, репродуктивные усилия и остаточная репродуктивная ценность. Компромиссы, морфофункциональные ограничения и генетические вариации определяют эволюцию жизненных циклов посредством естественного отбора (Ramírez-Llodra, 2002). Плодовитость — это количество потомков, продуцируемых самкой в определенный период времени. Выделяют три категории плодовитости декапод: потенциальная плодовитость — количество ооцитов в яйцнике, включая развивающиеся и зрелые клетки; реализованная плодовитость — количество яиц, откладываемых на плеоподы, и фактическая плодовитость — количество вылупившихся личинок, позволяющее оценить успех оплодотворения и смертность эмбрионов (Anger, Moreira, 1998).

У декапод реализованная плодовитость ограничена доступным пространством на плеоне самки. У раков-отшельников данное ограничение усиливается из-за сокращения числа плеоподов в результате асимметрии плеона. У большинства видов Diogenidae и Paguridae у обоих полов отсутствуют первые плеоподы, а остальные плеоподы непарные (у самок обычно второй—пятый, реже второй—четвертый) (Tudge et al., 2012). Но, как и у других десятиногих, плодовитость раков-отшельников в первую очередь связана с размером самки (Волвенко, 1995; Gherardi, Cassidy, 1995; Macpherson, Raventos, 2004). Реализованная плодовитость относительно небольших литоральных раков-отшельников (*SL* от 1 до 5–6 мм), таких как *P. nigrofascia*, *P. minutus* и *P. proximus* (Goshima et al., 1996; Mishima, Henmi, 2008; Korn et al., 2018; Kornienko et al., 2019), варьирует от нескольких экземпляров до нескольких сотен яиц (табл. 1). У крупных видов кладка состоит из нескольких тысяч и десятков тысяч яиц (см., например: Wada et al., 2000; Mura et al., 2006). Поскольку в процессе эмбрионального развития размер яйца увеличивается, некоторые яйца из крупного выводка могут быть экструдированы. Вследствие этого реализованная и фактическая плодовитость различаются. Фактическая плодовитость может снижаться и из-за живущих внутри раковин гастропод хищников (книдарий, плоских червей, полихет, ракообразных), которые питаются яйцами раков-отшельников (Williams, 2003).

В ряде работ обсуждается вопрос о влиянии качества раковин на плодовитость раков-отшельников (Wilber, 1989; Elwood et al., 1995; Mantelatto et al., 2002, и др.). Так, самки литорального *P. bernhardus* в предпочтительных видах раковин откладывали яйца в начале сезона, производили больше яиц в первом выводке и чаще нерестились повторно, чем самки в менее подходящих раковинах (Elwood et al., 1995). Отмечена положительная корреляция между плодовитостью раков-отшельников, массой и внутренним объемом занимаемых ими раковин. Увеличение плодовитости самок, обитающих в больших раковинах, связано с большим пространством, доступным для кладки, и с тем, что эти раковины занимают более крупные особи, производящие большее количество яиц (Mantelatto, Garcia, 1999; Mantelatto et al., 2002). У *P. longicarpus* особи обоих полов, использовавшие низкозавитые округлые раковины гастропод, были крупнее особей, использовавших раковины с высокими завитками (Blackstone, 1985). Следовательно, самки в таких раковинах произведут более многочисленное потомство, чем самки этого же возраста в низкозавитых раковинах. Напротив, у *P. filholi* самки, предпочитавшие высокозавитые раковины *Batillaria*, откладывали большее количество яиц, чем самки, использовавшие раковины *Homalopoma* (см.: Yoshino, Goshima, 2001). Однако у литорального рака-отшельника *P. minutus* в течение сезона раз-

множения и в период покоя не обнаружено зависимости плодовитости от вида раковины (Yasuda et al., 2019). Предпочтение, отдаваемое в репродуктивный период самками этого рака-отшельника раковинам *Batillaria*, авторы объясняют тем, что данные раковины, возможно, обеспечивают лучшую защиту от хищников или снижают внутривидовую конкуренцию за ресурс между полами на время размножения. Существует мнение, что крупные самки, обитающие в поврежденных или обросших раковинах, реже участвуют в размножении (Wilber, 1989).

Предполагается, что, как и у *Brachyura* (Somerton, Meyers, 1983; Sainte-Marie, 1993), впервые участвующие в нересте самки раков-отшельников производят яиц меньше, чем самки этого же размера, нерестящиеся повторно (Mantelatto et al., 2002). Отмечено, что у видов, производящих за сезон размножения несколько поколений потомства, количество яиц, выметанных при первом нересте, больше, чем при повторном (Wada et al., 2000; Mura et al., 2006; Kornienko et al., 2019).

Широтные вариации репродуктивных моделей

Чтобы адаптироваться к сезонным изменениям температуры, осадков, доступности пищи и других факторов окружающей среды, многие виды проявляют пластичность в распределении своих репродуктивных усилий во времени. Следовательно, репродуктивные характеристики видов, ареалы которых включают разные климатические зоны, в разных частях ареала могут различаться (van de Kerk et al., 2016, а также цитируемые авторами работы). В первой половине прошлого столетия Торсон (Thorson, 1950) отметил, что у ракообразных, иглокожих, полихет, брюхоногих и двустворчатых моллюсков виды из Восточной Гренландии обычно имели более крупные яйца, чем родственные виды из более низких широт. Позже эта тенденция была подтверждена для многих декапод (Jones, Simons, 1983; Berkenbusch, Rowden, 2000; Lardies, Castilla, 2001; Terossi et al., 2010a; Wehrmann et al., 2012; Lira et al., 2015, и др.).

Сравнительные исследования репродуктивных параметров разных популяций декапод вдоль широтных градиентов обнаружили внутривидовые различия, в первую очередь связанные с размерами наступления половой зрелости у самок, с объемом яиц и количеством яиц в кладке. При низкой температуре замедляются темпы роста, что приводит к отсроченному достижению половой зрелости самок в высоких широтах. Продолжительность развития яиц напрямую зависит от температуры, поэтому в популяциях низких широт самки могут производить больше кладок в течение репродуктивного сезона и доля яйценосных самок будет больше (Jones, Simons, 1983). Плодовитость — очень пластичная характеристика в пределах, определенных биоэнергетикой и жизненной стратегией организма (Ramírez-Llo-

Таблица 1. Репродуктивные характеристики прибрежных видов раков-отшельников умеренных широт

Вид	Место обитания	Сезон размножения	Минимальный размер яйценосных самок, SL, мм	Плодовитость, экз.	Количество кладок за сезон	Источник
<i>Pagurus proximus</i> Komai, 2000*	Россия, Японское море, зал. Восток	Декабрь–август	1.1	28 – 2085	>1	Kornienko et al., 2019
	Северная Япония, зал. Хакодаге	Январь–июль	1.39	–	>1	Wada, Miima, 2003
<i>P. minutus</i> Hess, 1865	Россия, Японское море, зал. Восток,	Май–август	1.1	37 – 721	>1	Korn et al., 2018
	Центральная Япония, префектура Вакаяма	Декабрь–апрель	–	≈100–1400 (fig. 2a)	>1	Nakano et al., 2016
<i>P. brachiomastus</i> (Thalwitzer, 1892)*	Россия, Японское море, зал. Восток	Март–август	1.5	59–3612	>1	Корниенко, Селин, 2019
<i>P. nigrofascia</i> Komai, 1996*	Северная Япония, зал. Хакодаге	Апрель–февраль	2.8	151–325	1	Goshima et al., 1996
<i>P. middendorffii</i> Brandt, 1851	Южная Япония, зал. Фукуока	Март–декабрь	2.6	≈150–580 (fig.4)	1	Mishima, Henmi, 2008
	Северная Япония, зал. Хакодаге	Октябрь–март	1.2	–	1	Wada et al., 1995, 1996
<i>P. filholi</i> (de Man, 1887)	Северная Япония, зал. Хакодаге	Весь год	1.4	≈30–220 (fig. 2)	>1	Goshima et al., 1998
<i>P. lanuginosus</i> De Naan, 1849	Северная Япония, зал. Хакодаге	Октябрь–июль	4.37	≈1000–6500 (fig. 3)	>1	Wada et al., 2000
<i>P. bernhardus</i> (L.)	Юго-западная Англия, зал. Маунтс	Ноябрь–май	1.7	≈200 – 1200	>1	Lancaster, 1988, 1990
<i>P. exilis</i> (Benedict, 1892)	Аргентина, провинция Буэнос-Айрес	Весна–лето	–	114–2665	1	Terossi et al., 2010b
<i>Discorsopagurus schmitti</i> (Stevens, 1925)	США, Вашингтон, о-в Филадельго	Январь–апрель	1.1	14–496	–	Gherardi, Cassidy, 1995

*Виды, у которых отмечена эмбриональная диапауза; “–” – данные отсутствуют.

dra, 2002). Количество яиц в кладке у одинаковых по размеру самок увеличивается от высоких широт к низким, а размер яиц отрицательно коррелирует с их количеством. Это связано с тем, что энергия, которую можно вложить в размножение, ограничена; наблюдается компромисс между качеством и количеством потомства (Касьянов, 1989). В высоких широтах более крупные яйца обладают достаточным количеством желтка, чтобы поддерживать длительный период инкубации эмбрионов, характерный для развития беспозвоночных в холодных регионах (Thorson, 1950). Как следствие адаптации к низкой температуре в высоких широтах рассматривается и тенденция к сокращенному личиночному развитию декапод. Однако среди раков-отшельников сокращенное развитие обычно встречается у теплолюбивых диогенид, тогда как у представителей семейства Paguridae личиночное развитие включает 4 стадии зоза даже у крайних пределов распространения данной группы, как это показано для *P. comptus* из субантарктических вод (канал Бигл, Огненная Земля) (Lovrich, Thatje, 2006).

Важным аспектом репродуктивной стратегии являются сроки размножения, которые совпадают с наличием благоприятных условий и определяются фенотипической пластичностью репродуктивной модели, зависящей от окружающей среды (Giesel, 1976). Сравнение репродуктивных характеристик в двух пространственно разделенных популяциях обитающего у берегов Южной Америки рака-отшельника *P. exilis* показало, что у побережья Бразилии этот вид размножается круглый год, а в холодных прибрежных водах Аргентины — только весной и летом; яйценосные самки бразильской популяции крупнее, их плодовитость выше (от 317 до 2885 яиц, в среднем 1447 ± 831), чем в популяции у побережья Аргентины (от 114 до 2665 яиц, в среднем 987 ± 711), однако размер яиц в аргентинской популяции больше (Terossi et al., 2010b).

Небольшой прибрежный рак-отшельник *Pagurus nigrofascia* встречается у берегов Японии от южного Хоккайдо до Кюсю (Komai, 1996; Komai et al., 2015). Показано, что у северной границы его ареала (о-в Хоккайдо, зал. Хакодате, $41^{\circ}44' N$, $140^{\circ}36' E$) плодовитость самок ниже, чем у южной (о-в Кюсю, зал. Хаката, $33^{\circ}40' N$, $130^{\circ}25' E$) (Goshima et al., 1996; Mishima, Henmi, 2008). Самки этого вида производят только одну кладку яиц в год, и хотя сведения о размере яиц *P. nigrofascia* из Хакодате отсутствуют, предполагается, что репродуктивное усилие раков-отшельников в южной популяции выше (Mishima, Henmi, 2008).

Продолжительность инкубационного периода и эмбриональная диапауза

Известно, что продолжительность эмбрионального развития беспозвоночных зависит от температуры. У Decapoda холодных или умеренных вод инкубационный период длится от не-

скольких недель до нескольких месяцев. У видов, производящих больше одной кладки, в одном и том же районе по мере повышения температуры в течение сезона размножения продолжительность инкубационного периода может уменьшаться в несколько раз (Wear, 1974).

Эмбриональная диапауза — явление задержки эмбрионального развития, известное для многих ракообразных (Алексеев, 1990; Alekseev, Starobogatov, 1996). У декапод эмбриональная диапауза чаще встречается на ранних стадиях, когда спустя 3–4 сут после нереста на стадии гаструлы яйца перестают развиваться и находятся в периоде покоя от нескольких недель до нескольких месяцев; у ряда видов пауза в развитии отмечена и на более поздних стадиях (Wear, 1974; Moriyasu, Lanteigne, 1998; Stevens, 2006; Webb et al., 2007; Swiney, 2008).

Среди раков-отшельников эмбриональная диапауза впервые обнаружена у вида *P. nigrofascia*. Диапауза отмечена как у северной, так и у южной границы его распространения, однако продолжительность периода покоя в этих популяциях оказалась разной (Goshima et al., 1996; Mishima, Henmi, 2008). У берегов о-ва Хоккайдо первые яйценосные самки *P. nigrofascia* появлялись в апреле, но яйца в кладках оставались на начальных стадиях развития до ноября. Доля яйценосных самок снижалась в январе, в феврале наблюдался пик выхода личинок, а в марте самки с кладками не встречались (Goshima et al., 1996).

В южной популяции самки с яйцами на плеоподах появлялись в марте, развитие яиц активизировалось в ноябре. После возобновления эмбрионального развития его темпы в южной популяции были выше, чем в северной, и выход личинок наблюдался уже в декабре. В январе–феврале в зал. Хаката яйценосные самки *P. nigrofascia* отсутствовали. Таким образом, хотя период инкубации яиц в обеих популяциях продолжался около 9 мес., эмбриональная диапауза в северной популяции длилась около 7 мес., а в южной — около 8 мес. (Mishima, Henmi, 2008). Следует заметить, что и в северной, и в южной популяциях инкубационный период приходился на самое теплое время года (см.: World Sea Temperatures, 2019), а выход личинок отмечен при минимальных значениях температуры: в зал. Хакодате в феврале при температуре воды $3.2^{\circ}C$ (Goshima et al., 1996), в зал. Хаката, где минимум температуры (около $13^{\circ}C$) наблюдается в феврале–марте (см.: World Sea Temperatures, 2019), — в декабре (Mishima, Henmi, 2008).

Подтверждением того, что наличие эмбриональной диапаузы не является видоспецифичным признаком, служит развитие *P. proximus*, распространенного у побережья Японии от Хоккайдо до Хонсю и вдоль материкового побережья Японского моря от зал. Петра Великого до Корейского полуострова (Komai, 2000; Komai et al., 2015). Репродуктивные характеристики этого вида изучены в зал. Хакодате (о-в Хоккайдо) (Wada, Mima,

2003) и в зал. Восток (зал. Петра Великого) (Kornienko et al., 2019). В отличие от зал. Хакодате, для зал. Восток характерны низкие зимние температуры воды (до -1.9°C) и присутствие ледового покрова в декабре—марте (Степанов, 1976).

В зал. Хакодате яйценосные самки *P. proximus* встречаются в январе—июле. Уже в феврале—марте появляются самки с яйцами на последней стадии развития. В популяции развитие кладок идет несинхронно; за сезон размножения самки могут вынашивать более одной кладки яиц (Wada, Miya, 2003). В зал. Восток отдельные самки *P. proximus* приступают к нересту в декабре. Доля яйценосных самок увеличивается постепенно. К началу мая, когда температура воды в заливе составляет 10°C и выше, 100% самок несут на плеоподах яйца на начальных стадиях развития. В это время развитие эмбрионов синхронно активизируется, к концу мая — началу июня эмбриогенез завершается и личинки выходят в планктон. Таким образом, в зал. Восток нерест *P. proximus* и длительный инкубационный период наблюдаются зимой в самое холодное время. Как и в зал. Хакодате, в зал. Восток у *P. proximus* отмечен достоверно менее продуктивный повторный летний нерест (Kornienko et al., 2019). Таким образом, репродуктивная стратегия популяций одного вида, обитающих в разных климатических условиях, различается. В зал. Хакодате развитие яиц *P. proximus* в популяции несинхронное и начинается сразу после откладки, следовательно, выход личинок в планктон растянут во времени. В зал. Восток благодаря наличию эмбриональной диапаузы развитие яиц синхронизируется, обеспечивая одновременный выход личинок в наиболее благоприятный период и массовое пополнение популяции. Менее продуктивный повторный нерест позволяет скорректировать влияние негативных последствий непредсказуемых условий среды.

Сравнительный анализ репродуктивных стратегий *P. nigrofascia* и *P. proximus*, в развитии которых отмечена эмбриональная диапауза, показал, что последовательность репродуктивных событий у этих видов несколько различается. Если у *P. nigrofascia* длительный инкубационный период приурочен к наиболее теплomu времени года (согласно World Sea Temperatures, 2019, температура воды в августе в зал. Хакодате достигает 24°C , в зал. Хаката — 29°C), а выход личинок — к периоду, когда температура воды минимальна, то у *P. proximus* в зал. Восток развитие с диапаузой происходит при низких температурах (Kornienko et al., 2019), а личинки появляются в планктоне в начале июня при температуре не выше $13\text{--}15^{\circ}\text{C}$.

Обитание в районах с ярко выраженной сезонностью и периодическими низкими температурами не обязательно приводит к появлению эмбриональной диапаузы. В зал. Восток обитают 12 видов раков-отшельников (Марин, Корниенко, 2014), репродуктивные характеристики изучены у трех самых массовых прибрежных видов: *P. minu-*

tus, *P. proximus* и *P. brachiomastus* (Korn et al., 2018; Kornienko et al., 2019; Корниенко, Селин, 2019). Кроме *P. proximus* период покоя в развитии яиц обнаружен у *P. brachiomastus* — третьего по численности вида. У *P. brachiomastus* яйценосные самки появляются в марте, яйца в кладках остаются на начальных стадиях развития до начала мая, доля самок с яйцами в это время составляет около 80%, следовательно, часть самок приступает к нересту позже, в июне—августе. Основная масса личинок выходит в планктон в начале лета, а затем синхронность выхода личинок нарушается (Корниенко, Селин, 2019). Мелкий прибрежный рак-отшельник *P. minutus* распространен у берегов Японии от о-ва Хоккайдо до о-ва Рюкю и вдоль материкового побережья от зал. Петра Великого до Кореи и северного Китая (Komai et al., 2015). В зал. Восток это самый массовый вид среди прибрежных раков-отшельников (Селин и др., 2016). Репродуктивные характеристики *P. minutus* исследованы в Японии в зал. Тоса (о-в Сикоку) (см.: Wada et al., 2005) и в эстуарии р. Вака (о-в Хонсю) (см.: Nakano et al., 2016; Yasuda et al., 2017), а также у берегов России (зал. Восток, Японское море) (см.: Korn et al., 2018). В разных популяциях этого вида время и продолжительность нерестового периода различаются, но самки всегда откладывают несколько кладок за сезон размножения, и развитие яиц идет без периода покоя (табл. 1).

Считается, что диапауза синхронизирует жизненный цикл животного с сезонным ритмом внешней среды и в неблагоприятные периоды позволяет переносить воздействие комплекса угнетающих или даже смертельных условий (Alekseev, Starobogatov, 1996). Сравнение репродуктивных циклов *P. nigrofascia* и *P. proximus*, в развитии которых отмечена диапауза, в известной степени служит подтверждением этому. Очевидно, что планктонная личиночная стадия развития — наиболее уязвимый период жизненного цикла декапод, поэтому появление личинок приурочено к благоприятному периоду, ограниченному определенным диапазоном температур, и диапауза способствует этому.

Предполагается, что для появления диапаузы и повторного запуска развития яиц необходим стимул — периодически повторяющийся внешний фактор, который может быть использован в качестве сигнала для начала или окончания фазы покоя. Первыми среди таких факторов называют солнечную радиацию и связанную с ней температуру, а также фотопериод (Alekseev, Starobogatov, 1996; Alekseev et al., 2006). Однако сравнение репродуктивной биологии раков-отшельников *P. minutus* и *P. proximus* из двух разных мест обитания (о-в Хоккайдо и зал. Восток) позволяет предположить, что кроме перечисленных очевидных факторов, вероятно, существуют и другие, действующие более избирательно. В результате их влияния в зал. Восток у *P. proximus* при прочих

равных условиях появляется диапауза в развитии, а *P. minutus*, как и у берегов Японии, развивается без диапаузы.

Таким образом, производство относительно небольшого количества яиц на одну кладку и забота о потомстве, присущая ракам-отшельникам, как и другим Pleosomata, характеризуют их как К-стратегов. Обитание в раковине ограничивает количество вынашиваемых яиц, на количество потомства влияет и качество раковины. Возраст (размер) наступления половозрелости раков-отшельников также связан с использованием раковин разного размера. Живущим в небольших хрупких раковинах мелкоразмерным ракам-отшельникам достичь репродуктивного успеха позволяють ранняя половозрелость и высокое репродуктивное усилие. Для раков-отшельников, отличающихся крупными размерами и занимающих во взрослом состоянии большие прочные раковины, характерны позднее созревание и низкий уровень репродуктивного усилия. Такие ограничения репродуктивных характеристик, связанные с раковинами, существуют независимо от места обитания раков-отшельников, они характерны и для тропических видов, и для видов умеренных широт.

В умеренных широтах климатические условия в разных частях ареала могут заметно различаться. Сравнение репродуктивных характеристик раков-отшельников северных и южных популяций подтверждает существование внутривидовых широтных вариаций репродуктивных моделей. Различия касаются сроков размножения, длительности инкубационного периода, размеров наступления половой зрелости самок, а также объема и количества яиц в кладке. Однако в высоких широтах у раков-отшельников не отмечено тенденции к сокращенному личиночному развитию.

Климатические условия умеренных широт, в первую очередь температурные, ограничивают период, благоприятный для развития пелагических личинок раков-отшельников. Анализ литературных данных показал, что характерная для умеренных широт смена климатических условий определяет сезонность выхода личинок в планктон. Это происходит в довольно узком диапазоне температур, зависит от происхождения вида и может быть связано с периодами обилия фитопланктона. Длительность сезона размножения связана с продолжительностью инкубационного периода и с количеством кладок, генерируемых самкой за сезон. Инкубационный период у раков-отшельников умеренных широт может быть приурочен как к самому теплomu, так и к самому холодному времени года. У некоторых видов длительность инкубационного периода заметно увеличивается за счет эмбриональной диапаузы, которая позволяет синхронизировать выход личинок в наиболее подходящий период, обеспечивая массовое пополнение популяции (табл. 1). К настоящему времени присутствие эмбриональной диапаузы отмечено у нескольких видов раков-от-

шельников умеренных вод. Наличие диапаузы в развитии, как и ее длительность, не являются видоспецифическими характеристиками, а зависят от внешних условий. Проблема возникновения эмбриональной диапаузы у Decapoda еще ждет своих исследователей, и раки-отшельники умеренных широт могут стать удобным тест-объектом для ее решения, а сравнение репродуктивных характеристик популяций у границ ареала расширит наши знания о механизмах адаптации среди десятиногих, живущих в разных климатических условиях, и позволит выяснить механизмы, обеспечивающие репродуктивный успех вида.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Алексеев В.Р.* Диапауза ракообразных. Эколого-физиологические аспекты. М.: Наука. 1990. 144 с.
- Волвенко И.В.* Механизмы регуляции динамики численности и продукционная биология раков-отшельников. Владивосток: Дальнаука. 1995. 248 с.
- Касьянов В.Л.* Репродуктивная стратегия морских двустворчатых моллюсков и иглокожих. Л.: Наука. 1989. 179 с.
- Корниенко Е.С., Селин Н.И.* Популяционные и репродуктивные характеристики рака-отшельника *Pagurus brachiomastus* (Thallwitz, 1892) (Decapoda: Paguridae) из залива Петра Великого Японского моря // Биол. моря. 2019. Т. 45. № 3. С. 159–170.
- Марин И.Н., Корниенко Е.С.* Десятиногие ракообразные (Decapoda) залива Восток Японского моря // Биота и среда заповедников Дальнего Востока. 2014. № 2. С. 49–71.
- Милейковский С.А.* Личинки морских донных беспозвоночных и их роль в биологии моря. М.: Мир. 1985. 120 с.
- Пианка Э.* Эволюционная экология. М.: Мир. 1981. 400 с.
- Селин Н.И., Корниенко Е.С., Корн О.М.* Видовой состав и особенности распределения раков-отшельников (Decapoda: Paguroidea) в заливе Восток Японского моря // Биол. моря. 2016. Т. 42. № 6. С. 458–464.
- Степанов В.В.* Характеристика температуры и солёности вод залива Восток Японского моря // Биологические исследования залива Восток. Владивосток: ДВНЦ АН СССР. 1976. С. 12–22.
- Abrams P.A.* Sexual difference in resource use in hermit crabs: consequences and causes // Behavioral adaptations to intertidal life. New York: Plenum. 1988. P. 283–296.
- Alekseev V.R., Hwang J.-S., Tseng M.-H.* Diapause in aquatic invertebrates: what's known and what's next in research and medical application? // J. Mar. Sci. Technol. 2006. V. 14. № 4. P. 269–286.

- Alekseev V.R., Starobogatov Y.I. Types of diapause in Crustacea: definitions, distributions, evolution // *Hydrobiologia*. 1996. V. 320. P. 15–26.
- Anger K. The biology of decapod crustacean larvae. *Crustacean Issues*. Lisse, The Netherlands: A.A. Balkema. 2001. V. 14. 419 p.
- Anger K. Contributions of larval biology to crustacean research: a review // *Invertebr. Reprod. Dev.* 2006. V. 49. № 3. P. 175–205.
- Anger K., Moreira G.S. Morphometric and reproductive traits of tropical caridean shrimps // *J. Crustacean Biol.* 1998. V. 18. № 4. P. 823–838.
- Asakura A. Population ecology of the sand-dwelling hermit crab *Diogenes nitidimanus*. IV. Larval settlement // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1991. V. 78. P. 139–146.
- Asakura A. The evolution of mating systems in decapod crustaceans // *Decapod crustacean phylogenetics*. *Crustacean Issues*. Boca Raton: CRC Press; Taylor & Francis Group. 2009. P. 121–182.
- Balazy P., Kuklinski P., Włodarska-Kowalczyk M. et al. Hermit crabs (*Pagurus* spp.) at their northernmost range: distribution, abundance and shell use in the European Arctic // *Polar Res.* 2015. V. 34. P. 21412.
- Berkenbusch K., Rowden A.A. Latitudinal variation in the reproductive biology of the burrowing ghost shrimp *Callinassa filholi* (Decapoda: Thalassinidea) // *Mar. Biol.* 2000. V. 136. P. 497–504.
- Bertness M.D. Pattern and plasticity in tropical hermit crab growth and reproduction // *Am. Nat.* 1981. V. 117. № 5. P. 754–773.
- Blackstone N.W. The effects of shell size and shape on growth and form in the hermit crab *Pagurus longicarpus* // *Biol. Bull.* 1985. V. 168. № 1. P. 75–90.
- Bolaños J., Cuesta J.A., Hernández G. et al. Abbreviated larval development of *Tunicotheres moseri* (Rathbun, 1918) (Decapoda: Pinnotheridae), a rare case of parental care among brachyuran crabs // *Sci. Mar.* 2004. V. 68. P. 373–384.
- Bullock W., Dunbar S.G. Influence of motivation on behaviour in the hermit crab, *Pagurus samuelis* // *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 2009. V. 89. № 4. P. 775–779.
- Bullock W., Dunbar S.G. Shell and food acquisition behaviors: Evidence for Contextual Decision Hierarchies in hermit crabs // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2011. V. 398. P. 26–32.
- Buranelli R.C., Marcondes A.T.P., Carbonaro F.A. et al. Behavioral trade-off on shell exchange and exploration of the white spotwrist hermit crab *Pagurus criniticornis* (Crustacea, Anomura, Paguridae) // *Crustacean Res.* 2015. V. 44. P. 55–66.
- Calado R., Lin J., Rhyne A.L. et al. Marine ornamental decapods – Popular, pricey, and poorly studied // *J. Crustacean Biol.* 2003. V. 23. № 4. P. 963–973.
- Calado R., Nogueira N., dos Santos A. Extended parental care in a hermit crab of the genus *Calcinus* (Anomura: Diogenidae) // *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 2006. V. 86. P. 121–123.
- Carlson D., Ebersole J.P. Life-history variation among three temperate hermit crabs: the importance of size in reproductive strategies // *Biol. Bull.* 1995. V. 188. P. 329–337.
- Contreras-Garduño J., Córdoba-Aguilar A. Sexual selection in hermit crabs: a review and outlines of future research // *J. Zool.* 2006. V. 270. P. 595–605.
- Elwood R.W., Marks N., Dick J.T.A. Consequences of shell-species preferences for female reproductive success in the hermit crab *Pagurus bernhardus* // *Mar. Biol.* 1995. V. 123. P. 431–434.
- Fotheringham N. Hermit crab shells as a limiting resource // *Crustaceana*. 1976. V. 31. P. 194–197.
- Fotheringham N. Effects of shell utilization on reproduction pattern in tropical hermit crabs // *Mar. Biol.* 1980. V. 55. P. 287–293.
- Frameschi I.F., de Andrade L.S., Alencar C.E.R.D. et al. Life-history traits of the red brocade hermit crab *Dardanus insignis* on the subtropical Brazilian coast // *Mar. Biol. Res.* 2015. V. 11. № 3. P. 283–293.
- Gherardi F. Hermit crab larval behavior: depth regulation in *Discorsopagurus schmitti* (Stevens) // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1995. V. 192. P. 107–123.
- Gherardi F., Cassidy P.M. Life history patterns of *Discorsopagurus schmitti*, a hermit crab inhabiting polychaete tubes // *Biol. Bull.* 1995. V. 188. № 1. P. 68–77.
- Giesel J.T. Reproductive strategies as adaptations to life in temporally heterogeneous environments // *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1976. V. 7. P. 57–79.
- Gorny M. On the biogeography and ecology of the Southern Ocean decapod fauna // *Sci. Mar.* 1999. V. 63. Suppl. 1. P. 367–382.
- Goshima S., Kawashima T., Wada S. Mate choice by males of the hermit crab *Pagurus filholi*: do males assess ripeness and/or fecundity of females? // *Ecol. Res.* 1998. V. 13. P. 151–162.
- Goshima S., Wada S., Ohmori H. Reproductive biology of the hermit crab *Pagurus nigrofascia* (Anomura: Paguridae) // *Crustacean Res.* 1996. № 25. P. 86–92.
- Gravel B.E., Wong P.Y., Starks P.T., Pechenik J.A. The use of artificial shells for exploring shell preference in the marine hermit crab *Pagurus longicarpus* (Say) // *Ann. Zool. Fenn.* 2004. V. 41. P. 477–485.
- Harvey A.W., Colasurdo E.A. Effects of shell and food availability on metamorphosis in the hermit crabs *Pagurus hirsutiusculus* and *Pagurus granosimanus* // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1993. V. 165. P. 237–249.
- Hazlett B. The behavioral ecology of hermit crabs // *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1981. V. 12. P. 1–22.
- Hess G.S., Bauer R.T. Spermatophore transfer in the hermit crab *Clibanarius vittatus* (Crustacea, Anomura, Diogenidae) // *J. Morphol.* 2002. V. 253. P. 166–175.
- Huguet D., García Muñoz J.E., García Raso J.E., Cuesta J.A. Extended parental care in the freshwater shrimp genus *Dugastella* Bouvier (Decapoda, Atyidae, Paratyinae) // *Crustaceana*. 2011. V. 84. P. 251–255.
- Imafuku M. Sexual discrimination in the hermit crab *Pagurus geminus* // *J. Ethol.* 1986. V. 4. P. 39–47.
- Imazu M., Asakura A. Distribution, reproduction and shell utilization patterns in three species of intertidal hermit crabs on a rocky shore on the Pacific coast of Japan // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1994. V. 184. P. 41–65.
- Jones M.B., Simons M.J. Latitudinal variation in reproductive characteristics of a mud crab, *Helice crassa* (Grap-sidae) // *Bull. Mar. Sci.* 1983. V. 33. P. 656–670.
- Kaiser M.J., Ramsay K., Hughes R.N. Can fisheries influence interspecific competition in sympatric populations of hermit crabs? // *J. Nat. Hist.* 1998. V. 32. № 4. P. 521–531.
- Komai T. *Pagurus nigrofascia*, a new species of hermit crab (Decapoda: Anomura: Paguridae) from Japan // *Crustacean Res.* 1996. № 25. P. 59–72.
- Komai T. The identity of *Pagurus brachiomastus* and descriptions of two new species of *Pagurus* (Crustacea:

- Decapoda: Anomura: Paguridae) from the Northwestern Pacific // Species Diversity. 2000. V. 5. P. 229–265.
- Komai T., Saito Y., Myorin E. A new species of the hermit crab genus *Pagurus* Fabricius, 1775 (Crustacea: Decapoda: Anomura: Paguridae) from shallow coastal waters in Japan, with a checklist of the East Asian species of the genus // Zootaxa. 2015. V. 3918. P. 224–238.
- Korn O.M., Kornienko E.S., Selin N.I. Population biology and reproductive characteristics of the hermit crab *Pagurus minutus* Hess, 1865 (Decapoda: Anomura: Paguridae) in the northern part of the species range (Peter the Great Bay, the Sea of Japan) // Mar. Biol. Res. 2018. V. 14. № 8. P. 846–855.
- Kornienko E.S., Selin N.I., Korn O.M. Population and reproductive characteristics of the hermit crab *Pagurus proximus* Komai, 2000 (Decapoda: Anomura: Paguridae) in the northern part of the species range // J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 2019. V. 99. № 1. P. 101–109.
- Laidre M.E., Greggor A.L. Swarms of swift scavengers: ecological role of marine intertidal hermit crabs in California // Mar. Biol. 2015. V. 162. P. 969–977.
- Lancaster I. *Pagurus bernhardus* (L.) – An introduction to the natural history of hermit crabs // Field Stud. 1988. V. 7. P. 189–238.
- Lancaster I. Reproduction and life history strategy of the hermit crab *Pagurus bernhardus* // J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 1990. V. 70. P. 129–142.
- Lardies M.A., Castilla J.C. Latitudinal variation in the reproductive biology of the commensal crab *Pinnaxodes chilensis* (Decapoda: Pinnotheridae) along the Chilean coast // Mar. Biol. 2001. V. 139. P. 1125–1133.
- Lira J.J.P.R. de, Calado T.C.D.S., Rezende C.F., Silva J.R.F. Comparative biology of the crab *Goniopsis cruentata*: geographic variation of body size, sexual maturity, and allometric growth // Helgol. Mar. Res. 2015. V. 69. P. 335–342.
- Lovrich G.A., Thatje S. Reproductive and larval biology of the sub-Antarctic hermit crab *Pagurus comptus* reared in the laboratory // J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 2006. V. 86. P. 743–749.
- Macpherson E., Raventos N. Population structure and reproduction of three sympatric species of hermit crabs in the north-western Mediterranean // J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 2004. V. 84. P. 371–376.
- Mantelatto F.L.M., Garcia R.B. Reproductive potential of the hermit crab *Calcinus tibicen* (Crustacea, Anomura) from Ubatuba, São Paulo, Brazil // J. Crustacean Biol. 1999. V. 19. P. 268–275.
- Mantelatto F.L.M., Alarcon V.F., Garcia R.B. Egg production strategies of the tropical hermit crab *Paguristes tortugae* from Brazil // J. Crust. Biol. 2002. V. 22. № 2. P. 390–397.
- Martinelli J.M., Mantelatto F.L.M., Fransozo A. Population structure and breeding season of the south atlantic hermit crab, *Loxopagurus loxochelis* (Anomura, Diogenidae) from the Ubatuba region, Brazil // Crustaceana. 2002. V. 75. № 6. P. 791–802.
- McLaughlin P.A. Illustrated keys to families and genera of the superfamily Paguroidea (Crustacea: Decapoda: Anomura), with diagnoses of genera of Paguridae // Mem. Mus. Victoria. 2003. V. 60. P. 111–144.
- McLaughlin P.A., Komai T., Lemaitre R., Rahayu D.L. Annotated checklist of anomuran decapod crustaceans of the world (exclusive of the Kiwaioidea and families Chirostylidae and Galatheidae of the Galatheoidea) Part I – Lithodoidea, Lomisoidea and Paguroidea // Raffles Bull. Zool. 2010. V. 23. P. 5–107.
- Mishima S., Henmi Y. Reproduction and embryonic diapause in the hermit crab *Pagurus nigrofascia* // Crustacean Res. 2008. № 37. P. 26–34.
- Moriyasu M., Lanteigne C. Embryo development and reproductive cycle in the snow crab, *Chionoecetes opilio* (Crustacea: Majidae), in the southern Gulf of St. Lawrence, Canada // Can. J. Zool. 1998. V. 76. P. 2040–2048.
- Mura M., Orru F., Cau A. Reproduction strategy of the deep-sea hermit crabs *Pagurus alatus* and *Pagurus excavatus* of the Central-Western Mediterranean Sea // Hydrobiologia. 2006. V. 557. P. 51–57.
- Nakano R., Yasuda C.I., Koga T. Temporal changes in egg number and size during a single breeding season in the hermit crab *Pagurus minutus* // Jpn. J. Benthol. 2016. V. 71. P. 32–36.
- Oba T., Goshima S. Temporal and spatial settlement patterns of sympatric hermit crabs and the influence of shell resource availability // Mar. Biol. 2004. V. 144. P. 871–879.
- Pianka E.R. On r- and K-Selection // Am. Nat. 1970. V. 104. № 940. P. 592–597.
- Ramírez-Llodra E. Fecundity and life-history strategies in marine invertebrates // Adv. Mar. Biol. 2002. V. 43. P. 87–170.
- Reese E.S. Annual breeding seasons of three sympatric species of tropical intertidal hermit crabs, with a discussion of factors controlling breeding // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 1968. V. 2. P. 308–318.
- Rodríguez A., Cuesta J.A. Morphology of larval and first juvenile stages of the kangaroo shrimp *Dugastella valentina* (Crustacea, Decapoda, Caridea), a freshwater atyid with abbreviated development and parental care // Zootaxa. 2011. V. 2867. № 1. P. 43–58.
- Sainte-Marie B. Reproductive cycle and fecundity of primiparous and multiparous female snow crab *Chionoecetes opilio*, in the Northwest Gulf of Saint Lawrence // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 1993. V. 50. P. 2147–2156.
- Somerton D.A., Meyers W.S. Fecundity differences between primiparous and multiparous female alaskan tanner crab (*Chionoecetes bairdi*) // J. Crustacean Biol. 1983. V. 3. № 2. P. 183–186.
- Steibl S., Laforsch C. Disentangling the environmental impact of different human disturbances: a case study on islands // Sci. Rep. 2019. V. 9. P. 13712.
- Stevens B.G. Embryo development and morphometry in the blue king crab *Paralithodes platypus* studied by using image and cluster analysis // J. Shellfish Res. 2006. V. 25. № 2. P. 569–576.
- Swiney K.M. Egg extrusion, embryo development, timing and duration of eclosion, and incubation period of primiparous and multiparous tanner crabs (*Chionoecetes bairdi*) // J. Crustacean Biol. 2008. V. 28. № 2. P. 334–341.
- Tamaki A., Mandal S., Agata Y. et al. Complex vertical migration of larvae of the ghost shrimp, *Nihonotrypaea harmandi*, in inner shelf waters of western Kyushu, Japan // Estuarine, Coastal Shelf Sci. 2010. V. 86. P. 125–136.
- Terossi M., Wehrtmann I.S., Mantelatto F.L. Interpopulation comparison of reproduction of the atlantic shrimp *Hippolyte obliquimanus* (Caridea: Hippolytidae) // J. Crustacean Biol. 2010a. V. 30. № 4. P. 571–579.

- Terossi M., Torati L.S., Miranda I. et al.* Comparative reproductive biology of two southwestern Atlantic populations of the hermit crab *Pagurus exilis* (Crustacea: Anomura: Paguridae) // *Mar. Ecol.* 2010b. V. 31. P. 584–591.
- Thiel M.* Extended parental care in crustaceans – an update // *Rev. Chil. Hist. Nat.* 2003. V. 76. P. 205–218.
- Thorson G.* Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates // *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* 1950. V. 25. № 1. P. 1–45.
- Tomatsuri M., Kon K.* Impacts of ocean acidification on hermit crab communities through contrasting responses of *Pagurus filholi* (de Man, 1887) and *Clibanarius virescens* (Krauss, 1843) // *Aquat. Ecol.* 2019. V. 53. P. 569–580.
- Tudge C.C., Asakura A., Ah Yong S.T.* Infraorder Anomura MacLeay, 1838 // *The Crustacea*. Leiden; Boston: Brill. 2012. V. 9, part B. P. 221–335.
- Turra A., Leite F.P.P.* Population biology and growth of three sympatric species of intertidal hermit crabs in south-eastern Brazil // *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 2000. V. 80. P. 1061–1069.
- Turra A., Leite F.P.P.* The molding hypothesis: linking shell use with hermit crab growth, morphology, and shell-species selection // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2003. V. 265. P. 155–163.
- van de Kerk M., Jones L.C., Saucedo O., Lorenzen K.* The effect of latitudinal variation on shrimp reproductive strategies // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 5. P. e0155266.
- Vogt G.* Abbreviation of larval development and extension of brood care as key features of the evolution of freshwater Decapoda // *Biol. Rev.* 2013. V. 88. № 1. P. 81–116.
- Vogt G., Tolley L.* Brood care in freshwater crayfish and relationship with the offspring's sensory deficiencies // *J. Morphol.* 2004. V. 262. P. 566–582.
- Wada S., Goshima S., Nakao S.* Reproductive biology of the hermit crab *Pagurus middendorffii* Brandt (Decapoda: Anomura: Paguridae) // *Crustacean Res.* 1995. № 24. P. 23–32.
- Wada S., Kitaoka H., Goshima S.* Reproduction of the hermit crab *Pagurus lanuginosus* and comparison of reproductive traits among sympatric species // *J. Crustacean Biol.* 2000. V. 20. P. 474–478.
- Wada S., Mima A.* Reproductive characters of the hermit crab *Pagurus proximus* Komai, 2000 in Hakodate Bay, southern Hokkaido, Japan // *Crustacean Res.* 2003. V. 32. P. 73–78.
- Wada S., Mima A., Ito A.* Reproductive phenology of sympatric hermit crabs in temperate Japan // *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 2005. V. 85. P. 889–894.
- Wada S., Sonoda T., Goshima S.* Temporal size covariation of mating pairs of the hermit crab *Pagurus middendorffii* (Decapoda: Anomura: Paguridae) during a single breeding season // *Crustacean Res.* 1996. № 25. P. 158–164.
- Wear R.G.* Incubation in British decapod Crustacea, and the effects of temperature on the rate of success of embryonic development // *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 1974. V. 54. P. 745–762.
- Webb J.B., Eckert G.L., Shirley T.C., Tamone S.L.* Changes in embryonic development and hatching in *Chionoecetes opilio* (snow crab) with variation in incubation temperature // *Biol. Bull.* 2007. V. 213. P. 67–75.
- Wehrmann I.S., Miranda I., Lizana-Moreno C.A. et al.* Reproductive plasticity in *Petrolisthes armatus* (Anomura, Porcellanidae): a comparison between a Pacific and an Atlantic population // *Helgol. Mar. Res.* 2012. V. 66. P. 87–96.
- Wenner A.M.* Sex ratio as a function of size in marine Crustacea // *Am. Nat.* 1972. V. 106. № 949. P. 321–350.
- Westgate K.* The invasive Asian shore crab, a dominant species on southeastern Massachusetts beaches: a cause for concern // *Undergrad. Rev.* 2011. V. 7. P. 131–137.
- Wilber T.P.* Associations between gastropod shell characteristics and egg production in the hermit crab *Pagurus longicarpus* // *Oecologia*. 1989. V. 81. P. 6–15.
- Williams J.D.* The not so lonely lives of hermit crabs: studies on hermit crab symbionts // *Hofstra Horiz.* Fall. 2003. P. 15–18.
- Williams J.D., McDermott J.J.* Hermit crab biocoenoses: a worldwide review of the diversity and natural history of hermit crab associates // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2004. V. 305. № 1. P. 1–128.
- World Sea Temperatures, 2019 <https://www.seatemperature.org/>
- Yasuda C.I., Koga T.* Do weaponless males of the hermit crab *Pagurus minutus* give up contests without escalation? Behavior of intruders that lack their major cheliped in male–male contests // *J. Ethol.* 2016. V. 34. P. 249–254.
- Yasuda C.I., Otoda M., Nakano R. et al.* Seasonal change in sexual size dimorphism of the major cheliped in the hermit crab *Pagurus minutus* // *Ecol. Res.* 2017. V. 32. P. 347–357.
- Yasuda C.I., Takiya Y., Otoda M. et al.* Is the seasonal change of sexual differences in shell use by the hermit crab *Pagurus minutus* considered to be driven by growth or reproduction? // *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 2019. V. 99. № 4. P. 901–910.
- Yoshino K., Goshima S.* Functional roles of gastropod shells in the hermit crab *Pagurus filholi*: effects of shell size and species on fitness // *Benthos Res.* 2001. V. 56. № 2. P. 87–93.

Reproductive Strategy of Hermit Crabs in Temperate Waters

E. S. Kornienko

A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

This review paper examines the main characteristics of the reproductive strategy in hermit crabs: the sex ratio, the age (size) of onset of maturity, fecundity, and the duration of the incubation period, as well as their dependence on the availability and quality of accessible gastropod shells. The latitudinal variation in reproductive characteristics and the peculiarities of reproduction of coastal hermit crabs in temperate waters are discussed.

Keywords: Paguroidea, sex ratio, age of onset of maturity, fecundity, incubation period, embryonic diapause

УДК 591.522

ХАРАКТЕРИСТИКА НАГУЛЬНОГО СКОПЛЕНИЯ ГОРБАТОГО КИТА *MEGAPTERA NOVAEANGLIAE* (BOROWSKI, 1781) В ПРОЛИВЕ СЕНЯВИНА У ВОСТОЧНОГО ПОБЕРЕЖЬЯ ЧУКОТКИ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ФОТОИДЕНТИФИКАЦИИ

© 2020 г. О. В. Титова^{1,*}, И. Д. Федутин², О. А. Филатова^{2,3}, М. А. Антипин³,
А. М. Бурдин⁴, Э. Хойт⁵

¹Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН,
Москва 119071, Россия

²Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
Москва 119234, Россия

³ФГБУ “Национальный парк “Берингия”, Чукотский АО, пос. Провидения 689251, Россия

⁴Камчатский филиал Тихоокеанского института географии ДВО РАН,
Петропавловск-Камчатский 683000, Россия

⁵Общество охраны китов и дельфинов, DT65DD, Бридпорт, Дорсет, Великобритания

*e-mail: arizona_sunset@mail.ru

Поступила в редакцию 25.05.2019 г.

После доработки 21.10.2019 г.

Принята к публикации 28.11.2019 г.

В работе впервые описано нагульное скопление горбатых китов в прол. Сенявина на Чукотке. За два летне-осенних сезона 2017 и 2018 гг. было идентифицировано 143 особи. Более половины китов, обнаруженных в первый год, были встречены и на следующий год. Пространственное распределение кормящихся китов в разные годы существенно различалось, что может быть связано с использованием животными разных типов добычи. Состав нагульной группировки был относительно постоянным, с чуть более интенсивным притоком новых животных в течение сезона 2018 г. Расчетная численность скопления для 2017 г. составила $84(\pm 1.5) - 90(\pm 6.4)$ особей, для 2018 г. – $105(\pm 3.7) - 109(\pm 6.2)$ особей. При сравнении наших фотографий китов с фотокаatalogами других нагульных скоплений были обнаружены совпадения с Чукотским морем, Анадырским заливом, Командорскими и восточными Алеутскими островами. Среди районов размножения для китов из прол. Сенявина обнаружены совпадения лишь с китами акватории Гавайских островов. Мы предполагаем, что нагульное скопление горбачей в прол. Сенявина относительно стабильно между сезонами и в течение сезона. Наблюдается обмен животными с некоторыми другими районами нагула. Изучаемое скопление образовано преимущественно китами гавайской субпопуляции.

Ключевые слова: горбатый кит, Чукотка, прол. Сенявина, нагульное скопление, миграции, восстановление популяций, численность

DOI: 10.31857/S0134347520050113

Популяция горбатого кита *Megaptera novaeangliae* (Borowski, 1781) на Дальнем Востоке России была сильно подорвана коммерческим китобойным промыслом. В 1930-х гг. северное и восточное побережья Чукотки считались основными районами встреч этих китов в западной части Тихого океана (Томилин, 1937). В 1960-х гг. их численность здесь снизилась до критической (Berzin, Vladimirov, 1981).

В 1993–2011 гг. на Чукотке были организованы наблюдения за китообразными с привлечением местных промысловых бригад (Мельников, 2014). Автор отмечает резкое увеличение встреч горба-

чей во всех исследованных районах в 2010 г. Одним из мест наблюдений, обсуждаемых в работе В.В. Мельникова, был прол. Сенявина, где уже в октябре 2004 г. было зарегистрировано большое количество китов за одно наблюдение. Регулярно и в значительном количестве горбачей стали регистрировать в прол. Сенявина с 2010 г. (И.А. Загребин, личное сообщение).

В последние десятилетия одним из самых распространенных методов для исследования китообразных стала фотоидентификация (Katona, Whitehead, 1981). Возможность индивидуально различать животных позволяет точнее определять

их численность, массово отслеживать перемещение животных между разными районами, а также, накапливая повторные наблюдения одних и тех же особей, определять некоторые популяционные и физиологические параметры (Gabriele et al., 2001; Calambokidis, Barlow, 2004).

Работы по фотоидентификации горбатых китов в водах Чукотки до настоящего времени проводились дважды. В 2005 г. в рамках крупного международного проекта по изучению популяционной структуры и численности горбатых китов в северной части Тихого океана SPLASH (Structure of Populations, Levels of Abundance and Status of humpback whales in the North Pacific) был организован судовой рейс, охвативший прибрежную зону Чукотки от мыса Наварин до мыса Дежнева. Результатом этого рейса стала идентификация 27 горбачей в Анадырском заливе. Летом 2017 г. при поддержке Русского географического общества в Анадырском заливе была проведена целенаправленная работа по идентификации горбатых китов. За 10 выходов в море удалось идентифицировать 83 кита (Бурдин и др., 2017).

Ареал горбача представляет собой ряд мест размножения в тропических и субтропических широтах, где киты проводят зиму, а также множество дискретных прибрежных участков в водах средних и высоких широт, куда киты ежегодно мигрируют в летнее время для нагула. Повсеместно наблюдается сложная структура миграционных путей, связывающих эти части ареала (Baker et al., 2013).

В северной части Тихого океана выделяют пять районов размножения горбатых китов, на основании привязанности к которым всех горбачей северной Пацифики подразделяют на пять субпопуляций (Bettridge et al., 2015). В российских водах отмечены горбачи, принадлежащие к четырем из них. На Камчатке, Командорских островах и Курилах встречаются киты преимущественно окинавско-филиппинской и в меньшей степени гавайской субпопуляций; в Анадырском заливе киты гавайской субпопуляции преобладают. Горбачи мексиканской субпопуляции встречаются единично в Анадырском заливе и на Командорах (Titova et al., 2018). Считают, что в водах Дальнего Востока России нагуливается и так называемая вторая западно-тихоокеанская субпопуляция (Second West Pacific DPS), точное место размножения которой не определено. О ее существовании предполагают лишь по косвенным данным (Calambokidis et al., 2008).

В настоящей работе впервые описано относительно недавно сформировавшееся нагульное скопление горбатых китов в прол. Сенявина. Проведено сравнение распределения китов в августе–сентябре 2017 и 2018 гг., проанализирована стабильность состава животных на протяжении

периода наблюдений и оценена численность скопления. Сопоставляя фотокаталог горбачей прол. Сенявина с каталогами китов из других районов, мы получаем информацию о степени изолированности данного скопления и выясняем, животными какой субпопуляции оно образовано.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материал был собран в августе–сентябре 2017 и 2018 гг. в прол. Сенявина, Провиденский район Чукотского АО (рис. 1). Акватория этого пролива представляет собой комплекс относительно глубоководных фьордов ледникового происхождения, в котором из-за специфической розы ветров, высоких скал по периметру и частых проявлений остаточного вулканизма формируется особый более мягкий микроклимат по сравнению с таковым на окружающем ландшафте (Купецкий, 1996).

В 2017 г. базовый лагерь экспедиции располагался на кордоне национального парка “Берингия” в б. Гыльмымыль, в 2018 г. — в б. Румилет. Ежедневно при отсутствии осадков и силе ветра менее 4 баллов по шкале Бофорта к скоплению китов выходила исследовательская лодка “Zodiac Futura Mark III”. Осторожно приближаясь к животным, определяли координаты места встречи с помощью GPS и фотографировали по возможности всех китов, входящих в состав группы. Трек лодки записывался непрерывно на протяжении всего времени работы в море. Для фотосъемки использовали фотоаппараты Canon EOS-7D и Canon EOS-5D Mark III с телеобъективами 100–400 и 70–200 мм с экстендером 2×. Одновременно с фотосъемкой определяли тип активности животных (кормежка, отдых, перемещение, социальные взаимодействия). Одни и те же особи в течение дня могли быть зарегистрированы многократно. Среди встреченных китов по совокупности внешних признаков выделяли детенышей текущего года рождения и подростков, т.е. животных в возрасте более одного года, но еще не достигших зрелости. Признаками для выделения детенышей были заметно меньший размер тела и хвостовых лопастей, чем у соседних близко расположенных животных, а также постоянное или частое сопровождение одним конкретным взрослым животным, предположительно матерью. Признаком для выделения подростков служило наличие таких непостоянных элементов в окраске, как белизна на спинном плавнике и размытые или бледные очертания паттернов окраски на хвостовых лопастях (Blackmer et al., 2000). Для идентификации животных использовали нижнюю поверхность хвостовых лопастей, а также правую и левую сторону корпуса и спинного плавника. Информа-

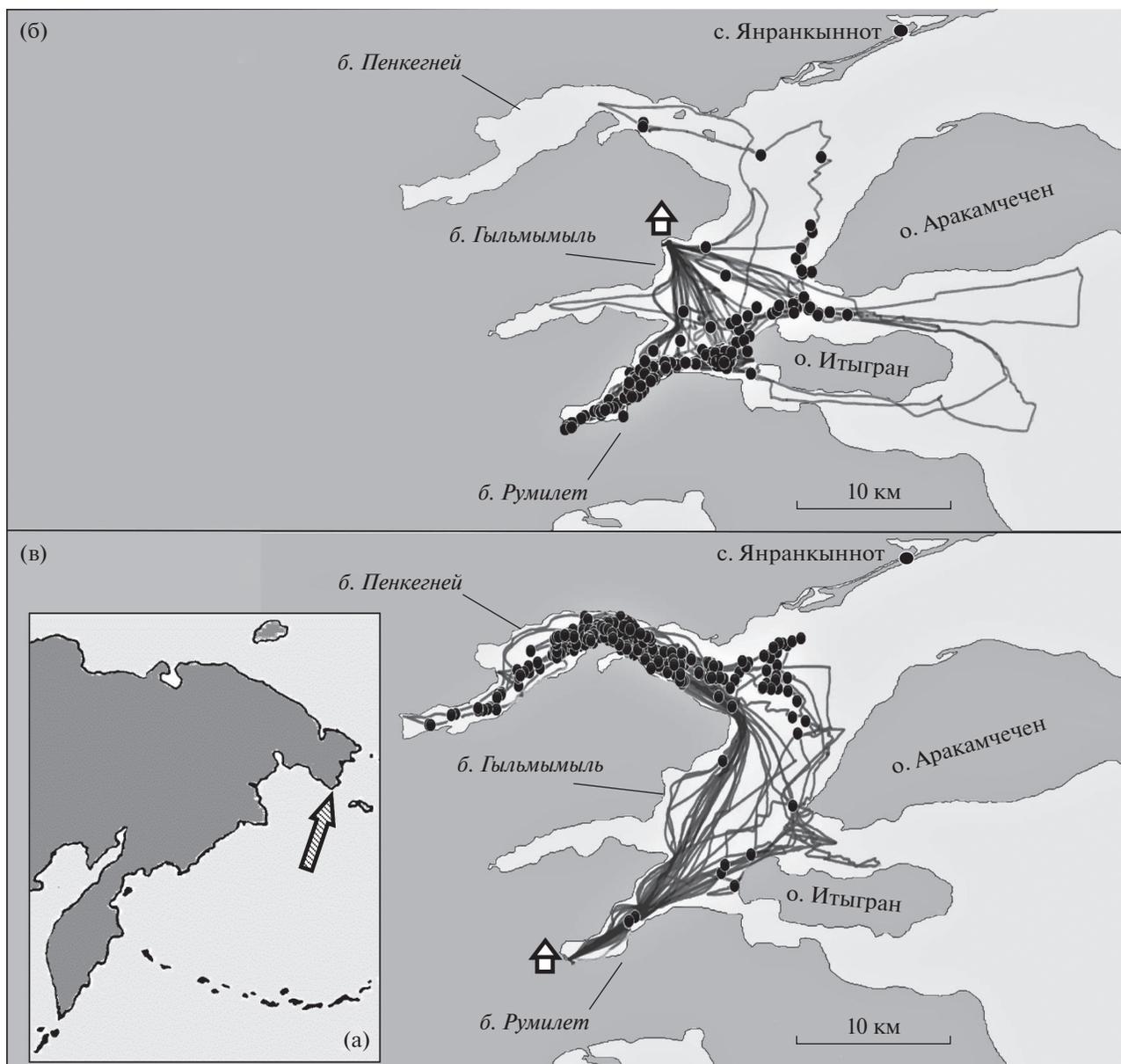


Рис. 1. Район работ и встречи китов в разные годы. Условные обозначения: “домики” – места расположения базового лагеря, линии – треки лодки, точки – встречи китов. а – расположение прол. Сенявина на общей карте региона, б – 2017 г.; в – 2018 г.

цию о встрече с каждой группой заносили в базу данных Microsoft Access 2010.

Для определения численности скопления в каждый из двух сезонов мы сформировали истории встреч конкретных особей, где отмечали их присутствие или отсутствие в выборке в течение каждого дня работы в море. На основании данных историй были составлены матрицы присутствия–отсутствия китов, по которым строили модели для расчета численности. При построении моделей для расчета численности китов на конкретной территории в определенный промежуток времени определяли дополнительные параметры.

Прежде всего это вероятность повторной встречи животных (Hammond, 1986). Определение данного параметра возможно лишь при условии, что вероятность повторной встречи для всех животных равна. В нашем случае для выполнения этого условия из расчета были исключены все киты, идентифицированные как детеныши текущего года, так как они редко поднимают хвостовые плавники перед погружением и их иногда сложно определить при встрече без сопровождения матери (Calambokidis et al., 2008). Другими параметрами для построения моделей расчета численности являются факторы, связанные с демографиче-

скими изменениями скопления на протяжении периода наблюдения (Cormack, 1989). Мы определяли численность скопления по модели для открытых популяций, а также по модели для закрытых популяций, чтобы оценить верхний предел численности. Расчет производили с помощью пакета Rcapture для среды статистической обработки данных R 3.3.2. (R Development Core Team, 2011). В качестве статистической оценки средних значений использовали стандартную ошибку (SE).

Для выяснения связей нагульного скопления в прол. Сенявина с другими районами нагула горбачей в дальневосточных морях России мы сравнили всех идентифицированных за время работы китов с общим каталогом горбатых китов Дальнего Востока, собранным в 2004–2017 гг. на Командорских островах, у берегов Камчатки, на Курильских островах, в Анадырском заливе и в других районах. Чтобы проследить связи изучаемого нагульного скопления с местами размножения горбачей, а также с районами нагула в восточной части Тихого океана, каталог, собранный в результате фотоидентификации в прол. Сенявина, сопоставили с каталогом проекта SPLASH, размещенным на вебсайте Cascadia Research Collective. Авторизованный доступ к этому каталогу нам был любезно предоставлен руководителями проекта. Фотографии животных сравнивали вручную, предварительно ранжируя китов на группы, выделенные по типу окраски хвостовых лопастей. Это позволило искать совпадения между однотипными изображениями, что значительно ускорило процесс работы. Подробнее методика сравнения каталогов описана нами ранее (Titova et al., 2018)

РЕЗУЛЬТАТЫ

Общее количество идентификаций и возрастной состав

За два сезона работ было идентифицировано 143 особи горбатого кита (табл. 1). Около половины китов, идентифицированных в 2017 г. (53%), встречены повторно в 2018 г. Ежедневно отмечали от двух-трех до 50 особей и более. Это были преимущественно взрослые животные. Две пары мать–детеныш встретились в 2017 г. и пять пар – в 2018 г. Причем из пяти самок с детенышами, встреченных в 2018 г., три самки были встречены в 2017 г. беременными. По размеру тела и особенностям окраски всего несколько китов были определены как подростки. Метод определения возраста без проведения измерений является неточным, поэтому количество молодых животных следует считать приблизительным. Лишь один кит (17RUCO1888) в 2018 г. был точно определен как подросток, так как в 2017 г. он был встречен детенышем в сопровождении матери.

Пространственное распределение китов в разные годы

Места концентрации животных в 2017 и 2018 гг. существенно различались (рис. 1). В 2017 г. киты держались главным образом к юго-западу от о-ва Итыгран, а ближе к концу сезона постепенно переместились в б. Румилет. В 2018 г. они встречались в основном в б. Пенкегней в северной части пролива. Район концентрации китов в 2017 г. ежедневно обследовали по пути из лагеря к месту работ и в 2018 г., однако горбачи встречались там крайне редко.

Динамика накопления идентификаций в течение сезона

Для оценки активности обновления состава скопления в течение сезона мы определили, насколько отличается скорость накопления идентификаций новых животных от скорости накопления всех идентификаций. За единицу прироста идентификаций взята одна идентификация каждого животного в один день. Новыми считались животные, впервые встреченные в данный сезон. Оказалось, что график скорости накопления новых особей в 2017 г. к концу сезона практически вышел на плато (рис. 2), т.е. встречались в основном уже знакомые киты. В 2018 г. накопление новых животных происходило в течение всего периода работы, но к концу сезона также наблюдали тенденцию к выходу графика на плато.

Численность

Расчет численности скопления китов с помощью модели CJS (Cormack-Jolly-Seber) для открытых популяций дал для каждого года исследований оценку, близкую к количеству идентифицированных животных. Верхний предел численности китов, определенный с помощью модели для закрытой популяции (Mh Chao), которая была выбрана на основании критерия Акаике (AIC), лишь немного отличается от этого значения. Для 2017 г. расчетная численность скопления составляла $84.0(\pm 1.5) - 90(\pm 6.4)$ особей, а для 2018 г. – $105(\pm 3.7) - 109(\pm 6.2)$ особей.

Повторные встречи китов в других нагульных районах и миграционные связи с местами размножения

Всего в сравнении участвовало 143 кита, идентифицированных в прол. Сенявина, и 10808 особей, идентифицированных в других нагульных и репродуктивных районах северной части Тихого океана. Среди прочих нагульных районов повторные встречи были обнаружены в Чукотском море, Анадырском заливе, у Командорских и восточных Алеутских островов. В районе Командорских

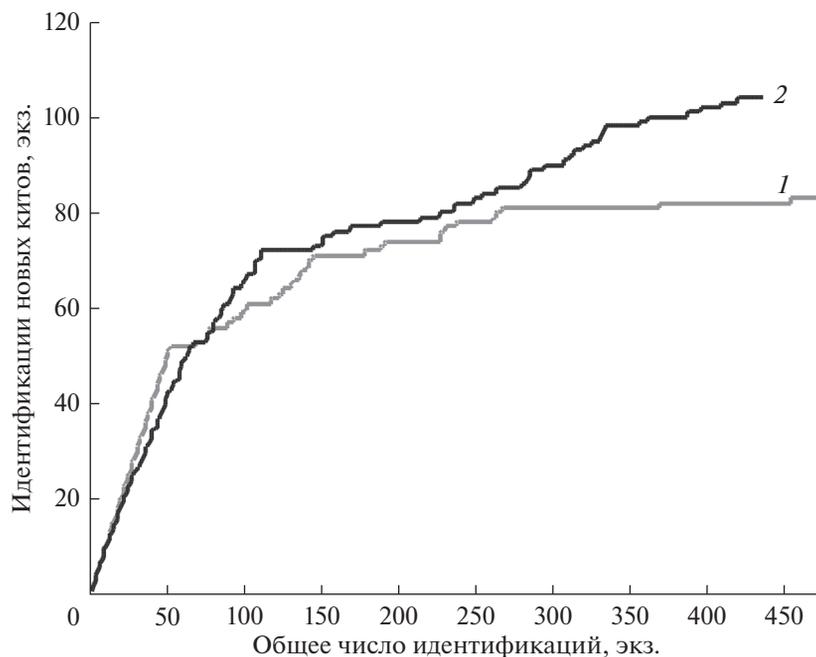


Рис. 2. Кривая накопления идентификаций новых китов. 1 — 2017 г.; 2 — 2018 г.

островов повторно были встречены две особи, во всех остальных районах — по одной (рис. 3). Среди четырех известных районов размножения горбатых китов мы обнаружили повторные встречи животных из прол. Сенявина только в водах Гавайских островов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Прибрежная акватория Чукотского полуострова является труднодоступным и слабо изученным регионом. Из-за наблюдающегося в последние десятилетия изменения климата особый интерес представляет состояние динамично меняющихся арктических экосистем. Популяции горбатых китов, сильно пострадавшие от коммерческого китобойного промысла, в настоящее время активно восстанавливаются и постепенно занимают прежние районы обитания (Barlow et al., 2011). Однако, несмотря на общее восстановление численности животных, некоторые субпопуляции до сих пор остаются в статусе угрожаемых (Bettridge et al., 2015).

Особый гидрологический режим прол. Сенявина с относительно мягким микроклиматом и резкими перепадами глубин, по-видимому, создает благоприятные условия для формирования кормовой базы горбатых китов. Постоянное присутствие китов в прол. Сенявина из года в год и продолжительное в течение нагульного сезона может быть свидетельством обилия и доступности потенциальных кормовых объектов в этом районе. Около половины животных из встречен-

ных в первый сезон были отмечены повторно в следующем году, в том числе несколько самок с детенышами. Это позволяет говорить о формировании устойчивой привязанности горбачей к данному району.

Примечательно резкое различие в распределении китов на изучаемой акватории в разные годы наблюдений. В 2017 г. большая часть встреч пришлась на участки с глубинами 50–80 м. В начале сентября животные активно кормились на мелководьях б. Румилет, где глубина не превышала 20 м. В 2018 г. все киты были встречены в расположенной к северу более глубоководной б. Пенкегней. Эти различия могут быть связаны с тем, что в разные годы киты использовали разные виды пищи. Поскольку детальное изучение объектов питания горбатых китов в прол. Сенявина не входило в задачи данного исследования, основанием для такого предположения послужили некоторые косвенные наблюдения. В 2017 г. мы нередко наблюдали, как группы кормящихся китов сопровождали скопления таких рыбадных птиц, как моевка *Rissa tridactyla* и кайра *Uria* sp., а также видели, как птицы добывали рыбу из приповерхностного слоя воды в непосредственной близости от кормящихся горбачей. В 2018 г. сопровождения китов птицами практически не наблюдали, хотя именно в б. Пенкегней расположены крупные птичьи базары. В 2017 г. регулярно отмечали оживленную и массовую кормежку горбачей в течение дня, что характерно при питании активной в дневное время песчанкой *Ammodytes hexapterus* (см.: Hazen et al., 2009), а также может быть связано с дневным под-

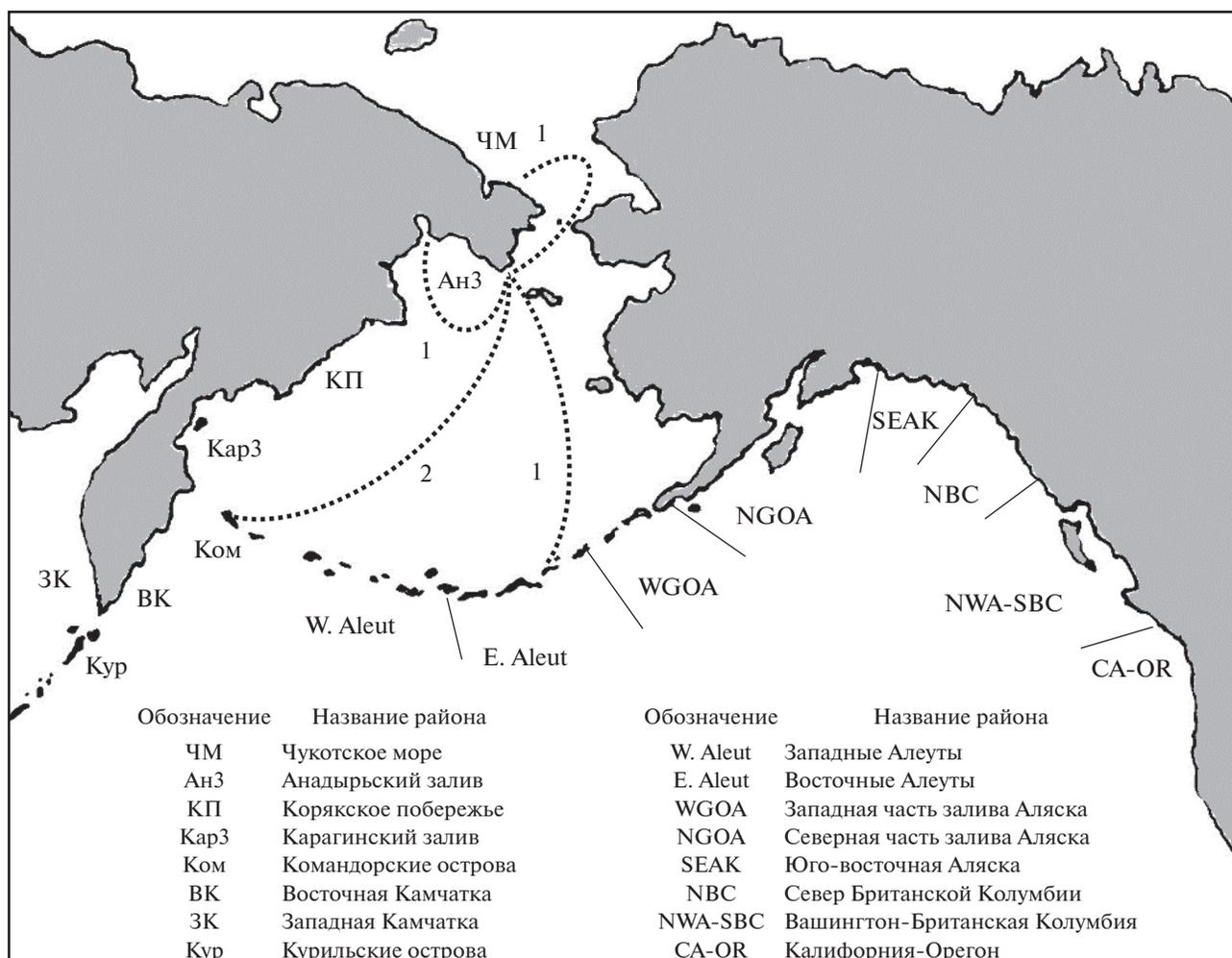


Рис. 3. Схема перемещений горбатых китов между нагульным районом в прол. Сенявина и другими районами нагула северной части Тихого океана. Цифры – количество совпадений в разных каталогах. Зонирование восточной части Северной Пацифики приведено по: Calambokidis et al., 2008.

нятием в толщу воды сайки *Boreogadus saida* (см.: Фадеев, 2005). В 2018 г. киты обычно отдыхали в светлое время суток и начинали кормиться с приближением сумерек, что может быть приурочено к вечерней вертикальной миграции планктонных ракообразных (Волков, Волвенко, 2016).

Накопление идентификаций, как правило, было наиболее активным в первые несколько дней работы, позже встречались преимущественно уже знакомые животные. В конце наблюдений 2017 г. новых китов практически не прибавилось. В 2018 г. интенсивность идентификации новых животных к концу сезона также снизилась. Эта динамика свидетельствует о том, что в акватории большинство особей уже зарегистрировано и активного подхода новых или транзитных китов не происходит, т.е. скопление в течение длительного периода наблюдений относительно стабильно.

О стабильности состава скопления в период работы говорит и то, что расчетная численность

оказалась близка к числу китов, идентифицированных в соответствующий год исследований. До настоящего момента численность горбачей в водах Дальнего Востока России была оценена лишь однажды более 10 лет назад в ходе работы по проекту SPLASH. Она составила приблизительно 100–200 особей во всех районах. В настоящее время получена численность около 100 животных только в одном из таких районов. Несколько более высокие значения при оценке численности в 2018 г. можно объяснить как естественным приростом популяции китов, так и приходом животных из других акваторий.

Несмотря на привязанность горбатых китов к конкретному нагульному району, отдельные животные могут ежегодно перемещаться в другие преимущественно соседние районы (Calambokidis et al., 2008). Как было показано в зал. Мэн, это тесно связано с изменением численности объектов питания (Weinrich et al., 1997). Однако

Таблица 1. Общее количество идентификаций и возрастной состав горбатых китов нагульного скопления в прол. Сенявина в 2017 и 2018 гг.

Год	Продолжительность наблюдений	Дней с китами	Всего встреч, экз.	Повторные встречи между годами	Встречаемость, особь/сут	Ежедневные идентификации		Возрастные группы		
						макс.	ср.	дет.	подр.	взр.
2017	16.08–06.09	19	83	–	4.37	52	25	2	4	77
2018	03.08–07.09	15	104	44	6.87	50	29	5	2	97

Примечание. Дет. – детеныш, подр. – подросток, взр. – взрослая особь.

существуют и условные границы для таких перемещений, отграничивающие нагульные районы разных субпопуляций (Calambokidis et al., 1996). Мы наблюдали повторные встречи китов, идентифицированных в прол. Сенявина, как в соседних (Чукотское море, Анадырский залив), так и в достаточно удаленных районах (Командорские и восточные Алеутские острова). В предыдущих исследованиях показано перемещение отдельных животных и среди других районов нагула (Титова и др., 2018). Следовательно, обмен в той или иной мере происходит между всеми нагульными районами дальневосточных морей России. Однако между горбачами, приходящими для нагула в Карагинский залив и на Командорские острова, существуют достоверные генетические различия (Richard et al., 2018), что говорит о сложном характере распределения этих китов.

Результаты нашего исследования подтверждают предположение о том, что на Чукотке нагуливается преимущественно гавайская субпопуляция горбатых китов, ранее известная как американское стадо. Интересно, что в этом районе, в отличие от Анадырского залива, не было обнаружено китов из мексиканской и окинавско-филиппинской субпопуляций, несмотря на сравнимые объемы изученных материалов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №18-04-00462 в 2018 г. и гранта Pew Marine Fellowship в 2017 г.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность руководству и сотрудникам ФГБУ «Национальный парк «Берингия»:

В. Бычкову, И. Бобырю и А. Танко за помощь в организации работы на территории парка, а также О. Белюнич и С. Загребельному за помощь в решении логистических задач. Мы благодарны руководителю проекта SPLASH Джону Каламбокидису за предоставление доступа к каталогу горбачей Северной Пацифики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Волков А.Ф., Волвенко И.В. Сетной зоопланктон западной части Берингова моря: таблицы встречаемости, численности и биомассы. 1986–2013. Владивосток: ТИНРО-центр. 2016. 1153 с.
- Бурдин А.М., Кринова Л.С., Чукмасов П.В. Нагульные скопления горбатых китов в заливе Креста (Анадырский залив, Чукотка) в августе 2017 г. // Сохранение биоразнообразия Камчатки и прилегающих морей. Материалы XVIII международ. науч. конф. Петропавловск-Камчатский, 15–16 ноября 2017 г. С. 402–404.
- Купецкий В.Н. Ландшафты морей // Природа и ресурсы Чукотки. Вып. 5. Магадан: СВНЦ ДВО РАН. 1996. С. 41–47.
- Мельников В.В. Китообразные (Cetacea) тихоокеанского сектора Арктики: история промысла, современное распределение, миграции, численность. Владивосток: Дальнаука. 2014. 396 с.
- Титова О.В., Филатова О.А., Федутин И.Д. и др. Перемещения горбатых китов между нагульными скоплениями дальневосточных морей и их миграционные связи с местами размножения // Морские млекопитающие Голарктики: Тез. докл. 10-й международ. конф. 2018. Архангельск, Россия. 29 октября–02 ноября 2018 г. С. 99–100.
- Томилин А.Г. Киты Дальнего Востока // Уч. зап. МГУ. 1937. Т. 18. С. 119–167.
- Фадеев Н.С. Справочник по биологии и промыслу рыб северной части Тихого океана. Владивосток: ТИНРО-центр. 2005. 366 с.
- Baker C.S., Steel D., Calambokidis J. et al. Strong maternal fidelity and natal philopatry shape genetic structure in North Pacific humpback whales // Mar. Ecol.: Prog. Ser. 2013. V. 494. P. 291–306.
- Barlow J., Calambokidis J., Falcone E.A. et al. Humpback whale abundance in the North Pacific estimated by photographic capture-recapture with bias correction from simulation studies // Mar. Mammal Sci. 2011. V. 27. № 4. P. 793–818.
- Berzin A.A., Vladimirov V.L. Changes in the abundance of whalebone whales in the Pacific and the Antarctic since

- the cessation of their exploitation // Rep. Int. Whaling Comm. 1981. V. 31. P. 495–499.
- Bettridge S., Baker C., Barlow J. et al. Status review of the humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) under the Endangered Species Act // NOAA Technical Memorandum NMFS, NOAA-TM-NMFS-SWFSC-540. Washington, DC: U.S. Dep. of Commerce. 2015. 240 p.
- Blackmer A.L., Anderson S.K., Weinrich M.T. Temporal variability in features used to photo-identify humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) // Mar. Mammal Sci. 2000. V. 16. № 2. P. 338–354
- Calambokidis J., Steiger G.H., Evenson J.R. et al. Interchange and isolation of humpback whales off California and other North Pacific feeding grounds // Mar. Mammal Sci. 1996. V. 12. № 2. P. 215–226.
- Calambokidis J., Barlow J. Abundance of blue and humpback whales in the eastern North Pacific estimated by capture-recapture and line-transect methods // Mar. Mammal Sci. 2004. V. 20. № 1. P. 63–85.
- Calambokidis J., Falcone E.A., Quinn T.J. et al. SPLASH: Structure of Populations, Levels of Abundance and Status of Humpback Whales in the North Pacific // Final report for Contract AB133F-03-RP-00078 prepared by Cascadia Research for U.S. Dept of Commerce. Olympia, Wash.: Cascadia Research. 2008. 57 p.
- Cormack R.M. Log-linear models for capture-recapture // Biometrics. 1989. V. 45. P. 395–413.
- Gabriele C.M., Straley J.M., Mizroch S.A. et al. Estimating the mortality rate of humpback whale calves in the central North Pacific Ocean // Can. J. Zool. 2001. V. 79. № 4. P. 589–600.
- Hammond P.S. Estimating the size of naturally marked whale populations using capture-recapture techniques // Rep. Int. Whaling Comm. 1986. V. 8 (Special Issue). P. 253–282.
- Hazen E.L., Friedlaender A.S., Thompson M.A. et al. Fine-scale prey aggregations and foraging ecology of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) // Mar. Ecol.: Prog. Ser. 2009. V. 395. P. 75–89.
- Katona S.K., Whitehead H.P. Identifying humpback whales using their natural markings // Polar Rec. 1981. V. 20. P. 439–444.
- R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Found. for Statistical Computing. 2011. www.R-project.org:
- Richard G., Titova O.V., Fedutin I.D. et al. Cultural transmission of fine-scale fidelity to feeding sites may shape humpback whale genetic diversity in Russian Pacific waters // J. Hered. 2018. V. 109. № 7. P. 724–734.
- Titova O.V., Filatova O.A., Fedutin I.D. et al. Photo-identification matches of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) from feeding areas in Russian Far East seas and breeding grounds in the North Pacific // Mar. Mammal Sci. 2018. V. 34. № 1. P. 100–112.
- Weinrich M., Martin M., Griffiths R. et al. A shift in distribution of humpback whales, *Megaptera novaeangliae*, in response to prey in the southern Gulf of Maine // Fish. Bull. 1997. V. 95. № 4. P. 826–836.

Characteristics of the Feeding Aggregation Formed by Humpback Whales, *Megaptera novaeangliae* (Borowski, 1781), in the Senyavin Strait, off Eastern Chukotka Coast, According to Photo-Identification Data

O. V. Titova^a, I. D. Fedutin^b, O. A. Filatova^{b, c}, M. A. Antipin^c, A. M. Burdin^d, and E. Hoyt^e

^aSevertsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow 119071, Russia

^bFaculty of Biology, Moscow State University, Moscow 119234, Russia

^cBeringia National Park, Provideniya 689251, Russia

^dKamchatka Branch, Pacific Geographical Institute, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Petropavlovsk-Kamchatsky 683000, Russia

^eWhale and Dolphin Conservation, Bridport, Dorset DT65DD, United Kingdom

The present study provides the first description of the feeding aggregation recently formed by humpback whales in the Senyavin Strait, off eastern Chukotka. In total, 143 individuals were identified for two summer and fall seasons of 2017 and 2018. More than half of the whales recorded in the first year were encountered again in the following year. The spatial distribution of feeding whales varied substantially between years, which may be explained by a shift in prey use. The structure of the feeding aggregations remained relatively stable, with a slightly higher number of new animals observed during the season of 2018. The estimated size of the aggregation was from 84 (± 1.5) to 90 (± 6.4) individuals in 2017 and from 105 (± 3.7) to 109 (± 6.2) individuals in 2018. A comparison of the whale photographs taken by us with the catalogues from other feeding grounds yielded matches with individuals recorded from the Chukchi Sea, Gulf of Anadyr, and waters off the Commander Islands and the eastern Aleutian Islands. Among the breeding grounds, matches were found only with whales from the waters off the Hawaiian Islands. Thus, we hypothesize that the feeding aggregation in the Senyavin Strait is relatively stable between seasons and within one season. There is some exchange of individuals with some other feeding grounds. The aggregation under study is formed mainly by whales of the Hawaiian subpopulation.

Keywords: humpback whale, Chukotka, Senyavin Strait, feeding aggregation, migrations, population recovery, abundance

УДК 582.261/.279:518.1

РОСТ, РАЗМЕРНАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИИ, ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ И УЛЬТРАСТРУКТУРА МИКРОВОДОРОСЛИ *PICOCHLORUM MACULATUM* (CHLOROPHYTA) ПРИ СУБЛЕТАЛЬНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ МЕДИ

© 2020 г. Ж. В. Маркина^{1, 2, *}

¹Национальный научный центр морской биологии (ННЦМБ) им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток 690041, Россия

²Дальневосточный федеральный университет, Владивосток 690950, Россия

*e-mail: zhannav@mail.ru

Поступила в редакцию 27.06.2019 г.

После доработки 02.10.2019 г.

Принята к публикации 03.10.2019 г.

В течение семи суток исследовали влияние меди в концентрациях 100 и 200 мкг/л на динамику численности популяции, размер и ультраструктуру клеток, флуоресценцию хлорофилла *a*, мембранный потенциал митохондрий и содержание нейтральных липидов у микроводоросли *Picochlorum maculatum* (Chlorophyta). Показано, что в присутствии меди рост популяции ингибировался; размер и ультраструктура клеток не изменялись. Флуоресценция хлорофилла *a* была ниже контрольной в течение всего эксперимента; мембранный потенциал митохондрий снижался на третьи сутки, а на седьмые сутки восстанавливался. Содержание нейтральных липидов уменьшалось и к завершению опыта не достигало контрольного уровня.

Ключевые слова: *Picochlorum maculatum*, медь, хлорофилл *a*, мембранный потенциал митохондрий, нейтральные липиды, ультраструктура, проточная цитометрия

DOI: 10.31857/S0134347520050071

Микроводоросли – это первичные продуценты, привлекающие внимание исследователей на протяжении длительного времени. Экологические аспекты пресноводных зеленых микроводорослей изучены довольно хорошо, а морским одноклеточным водорослям уделяется меньше внимания (Tragin, Vaultot, 2018). Актуальным является исследование влияния тяжелых металлов, в частности меди, на жизнедеятельность микроводорослей. Интерес к меди обусловлен тем, что в определенном количестве она необходима для нормального роста микроводорослей, входит в состав ряда ферментов, например, пластоцианина и цитохромоксидазы, участвующих в работе электрон-транспортных цепей хлоропластов и митохондрий (Adams et al., 2016). Опубликованы сведения о динамике численности популяции и фотосинтетическом аппарате микроводорослей – главным поставщике энергии растению. В то же время состоянию митохондрий уделяется меньше внимания (Cid et al., 1996). Известно, что основные задачи митохондрий (электронный транспорт и окислительное фосфорилирование) дублируются в хлоропластах, а их функционирова-

ние зависит от условий среды и энергетических потребностей клетки (Machado, Soares, 2014).

Одним из последствий стресса является интенсивное продуцирование микроводорослями нейтральных липидов, которые при благоприятных условиях в небольшом количестве присутствуют в мембранах клетки. Нейтральные липиды выполняют сигнальную функцию, участвуют в поддержании энергетического гомеостаза клеток и перестройках клеточных мембран. Метаболизм липидов тесно связан с фотосинтезом, дыханием и другими физиологическими процессами (Соловченко, 2012; Рус et al., 2017).

В практике изучения влияния факторов среды на одноклеточные водоросли все чаще используется проточная цитометрия. Данный метод позволяет определить численность клеток, их размерную структуру и оценить физиологическое состояние микроводорослей (Нука et al., 2013). Работ с результатами исследования ультраструктурных изменений водорослей при воздействии меди с помощью этого метода немного, что, возможно, связано с его трудоемкостью. Так, показано, что при токсических концентрациях тяже-

лых металлов у водорослей происходит уменьшение крист в митохондриях (El-Naggar, Sheikh, 2014), наблюдаются дезинтеграция тилакоидов и их разрушение (Gouveia et al., 2013; Martínez-Ruiz, Martínez-Jerónimo, 2015; Chen et al., 2016), а также утолщение клеточной стенки (Shanab et al., 2012).

Цели настоящей работы – изучить рост и размерную структуру популяции, функционирование фотосинтетического аппарата и митохондрий, а также определить содержание и ультраструктуру клеток у зеленой микроводоросли *Picochlorum maculatum* (Butcher) Henley, Hironaka, Guillou, M. Buchheim, J. Buchheim, M. Fawley & K. Fawley, 2004. Она применяется в биотехнологии как источник липидов и незаменимых жирных кислот (Klinthong et al., 2015; Augustine et al., 2017) и в марикультуре в качестве корма для животных (Kumar et al., 2017), в связи с этим изучение ее биологии и экологии является актуальным.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектом исследования служила культура одноклеточной водоросли *Picochlorum maculatum*, выделенная из вод зал. Восток (Японское море). Водоросль была выращена в 100 мл культуральной *f* среды, приготовленной в колбах Эрленмейера объемом 250 мл на основе фильтрованной и стерилизованной морской воды соленостью 32‰ при температуре 18°C и интенсивности освещения 70 мкмоль/м²/с в области видимого света с фотопериодом 14 ч свет : 10 ч темнота (Орлова и др., 2011). В качестве инокулята использовали культуру на экспоненциальной стадии роста. Начальная концентрация клеток микроводоросли во всех опытах составляла 10×10^4 кл/мл, продолжительность экспериментов – 7 сут. Пробы для проточно-цитометрического анализа отбирали через трое и семь суток опыта, для ультраструктурного – через семь суток. Медь добавляли в виде $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; концентрации (100 и 200 мкг/л) указаны в пересчете на ионы меди.

Все показатели измеряли на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Для анализа записано 10 тыс. событий (частиц, регистрируемых в пробе) в течение каждого измерения. Клетки водоросли из общего числа событий, регистрируемых цитометром, выбирали по флуоресценции хлорофилла *a* (Нука et al., 2013). Диаметр клеток определяли с помощью калибровочных бусин (Molecular Probes, США) по показателю прямого светорассеяния. Значения показателя бокового светорассеяния использовали для относительной оценки внутренней структуры клеток (Jamers et al., 2009; Нука et al., 2013).

Интенсивность флуоресценции хлорофилла *a* регистрировали на длине волны 690 нм, длина волны возбуждения составляла 488 нм (Нука et al.,

2013). Для определения мембранного потенциала митохондрий использовали флуоресцентный краситель DiOC6(3) в течение 30 мин; длина волны возбуждения составляла 488 нм, испускания – 525 нм (Зурочка и др., 2014). Содержание нейтральных липидов определяли по флуоресценции флуорохрома Nile Red, окрашивание проводили в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте; длина волны возбуждения составляла 488 нм, испускания – 580 нм (Aleman-Nava et al., 2016).

Для электронно-микроскопического анализа клетки *P. maculatum* фиксировали в течение 2 ч в 2.5% глутаральдегиде, приготовленном на фосфатном буфере (pH 7.4), а затем в течение 1 ч в 1% четырехокиси осмия на этом же буфере. Материал обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации и ацетона, заливали в смесь эпона и аралдита (Fluka, Швейцария) по стандартной методике (Luft, 1961). Срезы толщиной 70 нм изготавливали на ультрамикротоме Ultracut R LEICA (Австрия), контрастировали 2% раствором уранилацетата и цитратом свинца по стандартной методике Рейнольдса (Reynolds, 1963). Срезы исследовали на трансмиссионном электронном микроскопе (ТЭМ) Libra 120 (Carl Zeiss, Германия).

Эксперименты проведены в трех повторностях, данные выражены в процентах к контролю (контроль – показатели, полученные без добавления меди). На графиках и в таблице представлены средние значения и стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Концентрация меди 100 мкг/л не оказывала влияния на численность клеток *Picochlorum maculatum* через трое суток опыта, а на седьмые сутки снижалась до 52% от контрольной (рис. 1а). Флуоресценция хлорофилла *a*, мембранный потенциал митохондрий и содержание нейтральных липидов незначительно снижались на третьи сутки (рис. 1б–1г). К завершению эксперимента мембранный потенциал митохондрий значимо не отличался от контрольного, остальные физиологические показатели оставались на прежнем уровне. Размер клеток не изменялся в течение экспозиции (табл. 1).

В контроле клетки *P. maculatum* имели овальную форму, типичную ультраструктуру, характерную для представителей зеленых водорослей (рис. 2а). Сравнительно крупный пристеночный хлоропласт содержал пластоглобулы. Ядро овальной формы диаметром 0.7–1.0 мкм располагалось на периферии, в апикальной части клетки находилась крупная вакуоль с электронно-светлым содержимым. Исследование ультраструктуры *P. maculatum* не выявило различий в строении протопласта и его элементов в контроле и при воздействии меди в концентрации 100 мкг/л (рис. 2б).

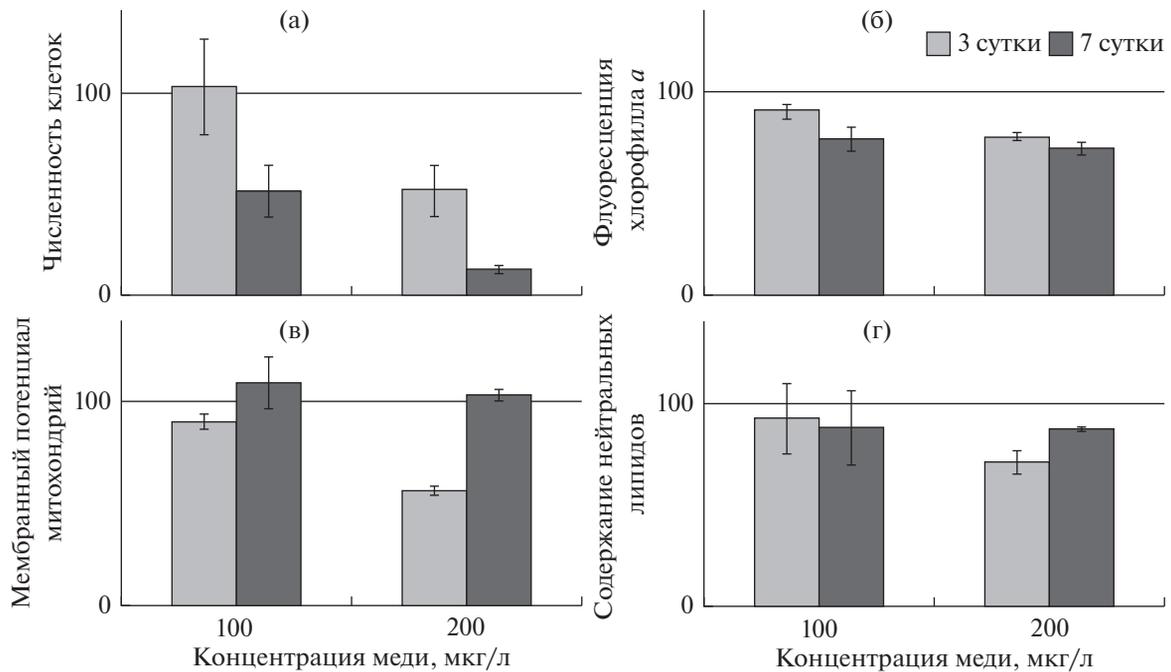


Рис. 1. Рост популяции и физиологическое состояние *Picochlorum maculatum* при воздействии меди. Данные выражены в процентах к контролю (показатели, полученные без добавления меди).

При концентрации меди 200 мкг/л численность клеток была в 2 раза ниже, чем в контроле; к окончанию эксперимента на третьи сутки опыта она составляла 13% от контроля (рис. 1а). Значения физиологических показателей снижались и, за исключением мембранного потенциала митохондрий, не восстанавливались в течение опыта. Размер клеток (табл. 1) и их ультраструктура (рис. 2в) не отличались от таковых в контроле.

ОБСУЖДЕНИЕ

Рост популяции *Picochlorum maculatum* ингибировался при концентрациях меди 100 и 200 мкг/л. Снижение роста до 30% от контроля отмечено у *Tetraselmis* sp. при концентрации меди 40 мкг/л (Adams et al., 2016). Показано, что при гибели клеток *P. maculatum* их размер не изменялся. В условиях стресса, как правило, наблюдалось укрупнение клеток. Это связано с тем, что энергии на процесс деления недостаточно, а необходимые для этого вещества продолжают накапли-

ваться, что способствует снижению удельной концентрации токсиканта внутри клетки (Cid et al., 1996). Метаболизм микроводоросли, по-видимому, перестраивается для поддержания ростовых процессов, а клетки с изменившимися ультраструктурой и размером элиминируются из популяции. В неблагоприятных условиях, в том числе при сублетальных концентрациях меди, организм может использовать энергию, предназначенную для роста, на другие клеточные процессы, необходимые для контроля и поддержания гомеостаза клетки (Perales-Vela et al., 2007). Причиной ингибирования клеточного деления является также способность меди связываться с сульфгидрильными группами, играющими важную роль в регуляции данного процесса (Miazek et al., 2015; Wang et al., 2018). Кроме этого, медь оказывает негативное действие на морфологию хромосом и клеточный цикл (Jiang et al., 2001).

Рост растений зависит от эффективного поглощения солнечной энергии и ее трансформа-

Таблица 1. Размер клеток (% от общего числа) *Picochlorum maculatum* при воздействии меди разной концентрации

T, сут	Контроль		100 мкг/л меди		200 мкг/л меди	
	2–4 мкм	>4 мкм	2–4 мкм	>4 мкм	2–4 мкм	>4 мкм
3	99.7 ± 0.4	0.3 ± 0.05	99.3 ± 0.7	0.1 ± 0.03	99.7 ± 1.6	0.3 ± 0.04
7	99.8 ± 0.6	0.2 ± 0.01	99.6 ± 1.3	0.4 ± 0.1	98.3 ± 1.5	1.2 ± 0.2

Примечание. T – продолжительность эксперимента.

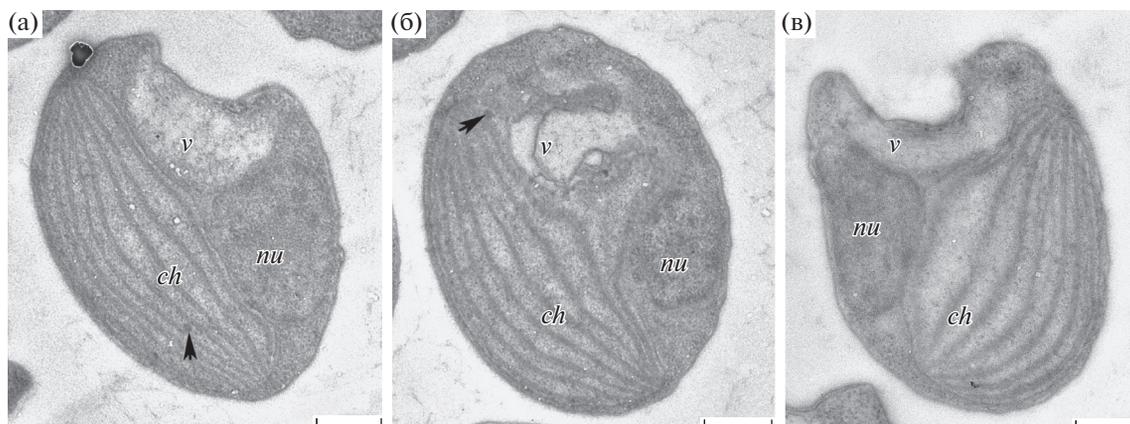


Рис. 2. Ультраструктура клеток *Picochlorum maculatum*. а – в контроле, б – при концентрации меди 100 мкг/л, в – 200 мкг/л (*ch* – хлоропласт, *nu* – ядро; *v* – вакуоль; стрелками отмечены пластоглобулы). Масштаб – 500 нм.

ции в химическую в форме НАДФ-Н⁺ и АТФ, а также от эффективной утилизации химической энергии в процессе фотосинтетической фиксации CO₂ (Perales-Vela et al., 2007). Снижение интенсивности флуоресценции хлорофилла *a* у *P. maculatum* может быть связано как с его непосредственным уменьшением (в результате ингибирования синтеза, разрушения, выхода из фотосинтетических мембран), так и с ингибированием фотосинтеза в результате работы электрон-транспортной цепи фотосистем (Титов и др., 2011; Wang et al., 2018). В литературе имеются сведения, что пластоглобулы участвуют в детоксикации тяжелых металлов, в токсических условиях отмечено формирование данных включений (Титов и др., 2011; El Nagger, Sheikh, 2014). Возможно, наличие пластоглобул способствует адаптации *P. maculatum* к воздействию меди.

Митохондрии – органеллы, быстро перестраивающиеся при изменении условий среды: их размер, количество и субклеточное распределение зависят от физиологических потребностей клетки. Мембранный потенциал митохондрий *P. maculatum* снижался при воздействии меди (рис. 1в), что свидетельствует о деполаризации мембран. Данное явление зарегистрировано у зеленой водоросли *Pseudokirchneriella subcapitata* при концентрации меди 80 мкг/л через трое суток опыта (Machado, Soares, 2014). При подавлении фотосинтеза микроводорослей усиливается роль митохондрий в метаболических процессах. Например, активация дыхания является следствием потребления энергии для обеспечения детоксикации меди. В целом процессы, связанные с обеспечением дыхания растений, более устойчивы к меди, чем фотосинтез (Perales-Vela et al., 2007).

При стрессовых условиях любой природы у водорослей часто наблюдается накопление нейтральных липидов, однако в настоящей работе

отмечено снижение их содержания. Это может быть связано с использованием нейтральных липидов при возрастающих энергозатратах клетки в токсических условиях. На примере другого тяжелого металла – кадмия показано, что его содержание в среде приводило к снижению количества нейтральных липидов и даже к разрушению липидных телец у микроводорослей (El-Nagger, Sheikh, 2014; Miazek et al., 2015).

Ультраструктура клеток *P. maculatum* при интоксикации медью оставалась сходной с таковой в контроле. Однако было неоднократно показано, что в присутствии в среде меди изменялось внутреннее строение клеток: увеличивались количество и размер вакуолей (Adams et al., 2016; Chen et al., 2016), происходило накопление крахмальных гранул и утолщение клеточной оболочки (El-Nagger, Sheikh, 2014). Известно, что вакуоли в условиях стресса способны накапливать ряд соединений, обладающих сильным антиоксидантным действием, что позволяет этим органеллам включаться в защиту клетки от окислительного стресса (Андреев, 2012). *P. maculatum* имеет крупную вакуоль, что обеспечивает водоросли поддержание физиологических процессов при воздействии меди. Так как в условиях эксперимента ее клеточная стенка оставалась неизменной и включений меди в органеллы клетки не обнаружено, можно предположить, что эта водоросль обладает механизмами экскреции меди в среду, снижающими токсическое действие металла.

Таким образом, наибольшее влияние медь оказывала на динамику численности *P. maculatum*, а не на физиологические процессы данной микроводоросли. Такие же результаты получены на пресноводной *Scenedesmus incrasatulus* (см.: Perales-Vela et al., 2007): при замедлении роста попу-

ляции фотосинтетический аппарат и митохондрии функционировали без изменений.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта 18-3-052 программы “Приоритетные научные исследования в интересах комплексного развития Дальневосточного отделения РАН”.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность Мирославе Алексеевне Сабуцкой (ННЦМБ) за помощь в ультраструктурном анализе. Культура микроводоросли *Picochlorum maculatum* (Chlorophyta) штамм MBRU_NM-86 предоставлена ресурсным центром “Морской био-банк” ННЦМБ ДВО РАН (<http://marbank.dvo.ru>). Проточно-цитометрический анализ выполнен в ННЦМБ ДВО РАН; автор искренне благодарит сотрудников Лаборатории клеточных технологий за помощь в работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреев И.М. Роль вакуоли в редокс-гомеостазе растительных клеток // Физиол. раст. 2012. Т. 59. С. 660–667.
- Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в медицине и биологии. 2-е изд., доп. и расш. Екатеринбург: РИО УрО РАН. 2014. 576 с.
- Орлова Т.Ю., Айздайчер Н.А., Стоник И.В. Лабораторное культивирование морских микроводорослей, включая продуцентов фитотоксинов: научно-метод. пособ. Владивосток: Дальнаука. 2011. 89 с.
- Соловченко А.Е. Физиологическая роль накопления нейтральных липидов эукариотическими микроводорослями при стрессах // Физиол. раст. 2012. Т. 59. С. 192–202.
- Титов А.Ф., Таланова В.В., Казнина Н.М. Физиологические основы устойчивости растений к тяжелым металлам: учеб. пособ. Институт биологии КарНЦ РАН. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. 2011. 77 с.
- Adams M.S., Dillon C.T., Vogt S. et al. Copper uptake, intracellular localization and speciation in marine microalgae measured by synchrotron radiation X-ray fluorescence and absorption microspectroscopy // Environ. Sci. Technol. 2016. V. 20. P. 1–25.
- Alemán-Nava G.S., Cuellar-Bermudez S.P., Cuaresma M. et al. How to use Nile Red, a selective fluorescent stain for microalgal neutral lipids // J. Microbiol. Methods. 2016. V. 128. P. 74–79.
- Augustine A., Kumaran J., Puthumana J. et al. Multifactorial interactions and optimization in biomass harvesting of marine picoalga *Picochlorum maculatum* MACC3 with different flocculants // Aquaculture. 2017. V. 474. P. 18–25.
- Chen Z., Song S., Wen Yu. et al. Toxicity of Cu (II) to the green alga *Chlorella vulgaris*: a perspective of photosynthesis and oxidant stress // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2016. V. 18. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6997-2>
- Cid A., Fidargo P., Herrero C., Abalde J. Toxic action of copper on the membrane system of a marine diatom measured by flow cytometry // Cytometry, Part A. 1996. V. 25. P. 32–36.
- El-Naggar A.H., Sheikh H.M. Response of the green microalga *Chlorella vulgaris* to the oxidative stress caused by some heavy metals // Life Sci. J. 2014. V. 11. P. 1349–1357.
- Gouveia C., Kreusch M., Schmidt É.C. et al. The effects of lead and copper on the cellular architecture and metabolism of the red alga *Gracilaria domingensis* // Microsc. Microanal. 2013. V. 19. P. 513–524.
- Hyka P., Lickova S., Přibyl P. et al. Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae // Biotechnol. Adv. 2013. V. 31. P. 2–16.
- Jamers A.N., Lenjou M., Deraedt P. et al. Flow cytometric analysis of the cadmium-exposed green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae) // Eur. J. Phycol. 2009. V. 44. P. 541–550.
- Jiang W., Liu D.H., Liu X. Effect of copper on root growth, cell division, and nucleolus of *Zea mays* // Biol. Plant. 2001. V. 44. P. 105–109.
- Klinthong W., Yang Y.-H., Huang C.-H., Tan C.-S. A review: microalgae and their applications in CO₂ capture and renewable energy // Aerosol Air Qual. Res. 2015. V. 15. P. 712–742.
- Kumar S.D., Santhanam P., Ananth S. et al. Evaluation of suitability of wastewater-grown microalgae (*Picochlorum maculatum*) and copepod (*Oithona rigida*) as live feed for white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* post-larvae // Aquacult. Int. 2017. V. 25. P. 393–411.
- Luft J.H.J. Improvements in epoxy resin embedding methods // J. Biophys. Biochem. Cytol. 1961. V. 9. P. 409–414.
- Machado M.D., Soares E.V. Modification of cell volume and proliferative capacity of *Pseudokirchneriella subcapitata* cells exposed to metal stress // Aquat. Toxicol. 2014. V. 147. P. 1–6.
- Martínez-Ruiz E.B., Martínez-Jerónimo F. Nickel has biochemical, physiological, and structural effects on the green microalga *Ankistrodesmus falcatus*: An integrative study // Aquat. Toxicol. 2015. V. 169. P. 27–36.
- Miażek K., Iwanek W., Remacle C. et al. Effect of metals, metalloids and metallic nanoparticles on microalgae

- growth and industrial products biosynthesis: a review // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. V. 16. P. 23929–23969.
- Perales-Vela H.V., González-Moreno S., Montes-Horcasitas C., Canizares-Villanueva R.O.* Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae) // *Chemosphere.* 2007. V. 67. P. 2274–2281.
- Рыс М., Cai Y., Greer M.S. et al.* Turning over a new leaf in lipid droplet biology // *Trends Plant Sci.* 2017. V. 22. P. 596–609.
- Reynolds E.* The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // *J. Cell Biol.* 1963. V. 17. P. 208–212.
- Shanab S., Essa A., Shalaby E.* Bioremoval capacity of three heavy metals by some microalgae species (Egyptian isolates) // *Plant Signal. Behav.* 2012. V. 7. № 3. P. 1–8.
- Tragin M., Vaulot P.* Green microalgae in marine coastal waters: the ocean sampling day (OSD) dataset // *Sci. Rep.* 2018. V. 18. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32338-w>
- Wang H., Ebenezer V., Ki J.-S.* Photosynthetic and biochemical responses of the freshwater green algae *Closterium ehrenbergii* Meneghini (Conjugatophyceae) exposed to the metal coppers and its implication for toxicity testing // *J. Microbiol.* 2018. V. 56. P. 426–434.

Growth, Population Size Structure, Physiological Changes and Ultrastructure of the Microalga *Picochlorum maculatum* (Chlorophyta) Under Sublethal Copper Concentrations

Zh. V. Markina^{a, b}

^a*A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia*

^b*Far Eastern Federal University, Vladivostok 690950, Russia*

This study examines the effect of copper (100 and 200 µg/L) on the cell number dynamics, cell size and ultrastructure, chlorophyll *a* fluorescence, mitochondrial membrane potential, and neutral lipid content in the microalga *Picochlorum maculatum* (Chlorophyta) during a 7-day exposure. The addition of copper led to the inhibition of population growth; the cell size and ultrastructure remained unchanged. The fluorescence of chlorophyll *a* was lower than in the control throughout the experiment; the mitochondrial membrane potential decreased on the third day, and it was recovered on the seventh day. The neutral lipid content decreased and did not reach the control level at the end of the experiment.

Keywords: *Picochlorum maculatum*, copper, chlorophyll *a*, mitochondrial membrane potential, neutral lipids, ultrastructure, flow cytometry

УДК 579.2/579.8

РАЗНООБРАЗИЕ И АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ДОННЫХ ОСАДКОВ ЧУКОТСКОГО МОРЯ

© 2020 г. Л. А. Романенко^{1,*}, В. В. Куриленко¹, Н. Ю. Чернышева¹,
К. В. Гузев¹, В. В. Михайлов^{1,2}

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии (ТИБОХ) им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
Владивосток 690022, Россия

²Дальневосточный федеральный университет,
Владивосток 690950, Россия

*e-mail: lro@piboc.dvo.ru

Поступила в редакцию 06.06.2019 г.

После доработки 02.10.2019 г.

Принята к публикации 03.10.2019 г.

Из образцов донных осадков Чукотского моря выделено и исследовано 248 штаммов гетеротрофных бактерий. На основании филогенетического анализа гена 16S рРНК были идентифицированы представители 33 родов, принадлежащие типам *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* и *Actinobacteria*. Восемь групп бактерий показали уровень сходства гена 16S рРНК не более 97–98% и могут представлять новые таксоны. Скрининг антимикробной активности выявил 40 штаммов, способных ингибировать рост двух и более индикаторных микроорганизмов. Активные штаммы представлены бактериями родов *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Terribacillus*, *Virgibacillus* (тип *Firmicutes*), *Streptomyces*, *Pseudonocardia*, *Nocardiosis* (*Actinobacteria*) и в меньшей степени грамотрицательными бактериями родов *Shewanella*, *Psychrobacter* (класс *Gamma proteobacteria*), *Massilia* (класс *Beta proteobacteria*), *Arenibacter* (тип *Bacteroidetes*). Обнаружение фрагментов генов поликетидсинтаз (PKS-1) и нерибосомных пептидсинтаз (NRPS) методом ПЦП с использованием вырожденных праймеров в 23 активных штаммах свидетельствует о том, что исследуемые бактерии могут служить источниками антимикробных метаболитов поликетидной природы и/или нерибосомных пептидов.

Ключевые слова: бактерии, филогения, гены 16S рРНК, PKS-1, NRPS, антимикробная активность, донные осадки, Чукотское море

DOI: 10.31857/S0134347520050083

Морские донные осадки являются природным источником биологического разнообразия, местом обитания и инкубатором для многих представителей морской биоты. Микроорганизмы донных осадков – это важный компонент морских экосистем, представляющий особый интерес для научных исследований (Lauro, Bartlett, 2008). Показано, что бактерии морской среды, в частности донных осадков, способны синтезировать разнообразные биологически активные вещества (БАВ) с антимикробными, противоопухолевыми и другими свойствами (Debbab et al., 2010; Penesyan et al., 2010; Pettit, 2011; Bhatnagar, Kim, 2012). Изучение микроорганизмов, изолированных из не исследованных ранее и малоизученных источников различных биотопов морской среды, является актуальным. Микроорганизмы донных осадков шельфа Чукотского моря исследованы фрагментарно (Yuan et al., 2014). Цель настоящей работы – изучение филогенетического разнообразия и антимикробной активности гетеротрофных бактерий, изолированных из образцов донных осадков Чукотского моря.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Пробы донных осадков отбирали в экспедиционном рейсе НИС “Академик Опарин” в сентябре 2016 г. в российском секторе Чукотского моря на 11 станциях в координатах: № 1 (71°21.44' N, 175° 36.70' W; глубина 36 м), № 2 (70°59.60' N, 177°35.8' W; 29 м), № 2/1 (71°01.18' N, 177°42.18' W; 23 м), № 5 (70°50.0' N, 179°42.0' W; 18 м), № 6 (70°31.01' N, 177°25.92' W; 50 м), № 11 (71°20.0' N, 173°04.90' W; 50 м), № 14 (69°54.02' N, 171°00.46' W; 44 м), № 16 (68°11.02' N, 169°10.83' W; 58 м), № 17 (67°25.98' N, 169°37.30' W; 50 м), № 18 (67°30.99' N, 171°21.80' W; 48 м), № 20 (67°32.44' N, 173°36.72' W; 42 м).

Штаммы бактерий выделяли методом прямого посева суспензии образцов грунта в разведениях на среды Морской агар 2216 (Marine Agar 2216), R2A (R2A Agar), Триптиказо-соевый агар (Tryptic soya agar, все – BD Difco) и др., как описано ранее (Romanenko et al., 2013a). Выделенные бактерии помещены на хранение в Коллекцию морских микроорганизмов (КММ) ТИБОХ ДВО РАН.

Исследование антимикробной активности выделенных штаммов в отношении тестовых мик-

роорганизмов *Escherichia coli* K-12 CL588, *Enterococcus faecium* CIP 104105, *Staphylococcus aureus* CIP 65.8^T, *Staphylococcus epidermidis* CIP 81.55^T, *Bacillus subtilis* CIP 52.65^T, *Xanthomonas* sp. pv. *badrii* LMG 546 и *Candida albicans* KMM 455 проводили, как описано ранее (Romanenko et al., 2008).

Нативную ДНК выделяли при помощи Genomic DNA Purification Kit (Fermentas). Фрагмент гена 16S рРНК амплифицировали с универсальными праймерами 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-ACGGCTACCTTGT-TACGACTT-3'), как описано в предыдущей работе (Romanenko et al., 2019). Амплификацию фрагментов генов PKS-1 и NRPS проводили с использованием олигонуклеотидных праймеров MD-PQRF/HGTGR и A3F/A7R соответственно, как описано ранее (Santos et al., 2015). Ожидаемые длины фрагментов генов для PKS-1 и NRPS составляли соответственно 700–800 и 600–700 п.н.

Очищенные ПЦР фрагменты гена 16S рРНК секвенировали с использованием ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) и Big Dye v.3.1 sequencing kit (Applied Biosystems, США). Процент сходства генов 16S рРНК с гомологичными генами типовых штаммов рассчитывали с помощью Eztaxon service (Kim et al., 2012). Филогенетический анализ проводили с использованием MEGA 6 (Tamura et al., 2013). Полученные нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК были депонированы в базе данных DDBJ/EMBL/GenBank под номерами доступа LC379505-LC379542.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Из образцов донных осадков, отобранных в Чукотском море на 11 станциях на глубине от 18 до 58 м, были выделены 248 штаммов бактерий. Бактериальные изоляты сначала группировали по морфологическим свойствам колоний, КОН-тесту, данным микроскопии и физиологическим тестам; из них более 70 штаммов были отобраны для секвенирования гена 16S рРНК. Филогенетические позиции изученных штаммов представлены в дендрограммах (рис. 1–3). На основании анализа гена 16S рРНК исследованные штаммы были отнесены к четырем типам: *Proteobacteria* (34%), *Bacteroidetes* (26%), *Firmicutes* (21%) и *Actinobacteria* (19%), среди которых протеобактерии были доминантной группой. Класс *Gammaproteobacteria* был представлен бактериями родов *Shewanella*, *Psychrobacter*, *Pseudoalteromonas* и *Halomonas*. Среди представителей *Alphaproteobacteria* были идентифицированы штаммы трех родов – *Loktanella*, *Sphingorhabdus* и *Ahrensia*. Класс *Betaproteobacteria* был представлен родами *Hydrogenophaga* и *Massilia* (рис. 1). Вторыми по численности были штаммы филума *Bacteroidetes* семейства *Flavobacteriaceae*, включая *Winogradskyella*, *Arenibacter* и *Maribacter* как преобладающие группы, а также *Sediminicola* и *Aquorivita* как минорные группы (рис. 2). Таксономический состав вы-

деленных бактерий, отнесенных к типу *Firmicutes*, характеризовался большим разнообразием и включал представителей девяти родов: *Bacillus*, *Sporosarcina*, *Paenisporsarcina*, *Domibacillus*, *Fictibacillus*, *Paenibacillus*, *Terribacillus*, *Oceanobacillus* и *Virgibacillus*. Многочисленными и разнообразными по родовому составу были также штаммы *Actinobacteria*, представленные бактериями 10 родов: *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Aeromicrobium*, *Pseudonocardia*, *Amycolatopsis*, *Salinibacterium*, *Agrococcus*, *Arthrobacter*, *Cellulosimicrobium* и *Nocardiopsis* (рис. 3). Филогенетический анализ показал, что большинство исследованных штаммов имели высокий уровень сходства (99–100%) в нуклеотидных последовательностях гена 16S рРНК с ранее известными видами бактерий, выделенными из морских и/или полярных источников. В то же время необходимо отметить, что штаммы родов *Massilia* (класс *Betaproteobacteria*), *Fictibacillus* и *Terribacillus* (*Firmicutes*) являются наземными микроорганизмами и редко выделяются из морских источников. По меньшей мере 8 групп, представленные штаммами Ch16, Ch26, Ch30, Ch38, Ch 100, Ch158/Ch160, Ch28 и Ch215/Ch235, показали уровень сходства гена 16S рРНК не более 97–98% и могут представлять новые таксоны. Так, штамм Ch26 имел только 92% сходства гена 16S рРНК с типовым штаммом *Empedobacter brevis*; штамм Ch100 показал 90% сходства с *Pseudonocardia ammonioxydans*, образуя удаленную монофилетическую ветвь среди актинобактерий. Филогенетически близкий к *Winogradskyella damuponensis* (97.2% сходства гена 16S рРНК) штамм Ch38 был предложен нами как новый вид *Winogradskyella profunda* (см.: Romanenko et al., 2019).

Скрининг антимикробной активности выявил 40 штаммов, которые были активны в отношении двух и более тест-культур. Большинство выделенных штаммов ингибировали рост *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. faecium*, *Xanthomonas* sp. pv. *badrii* и *C. albicans*. Активность в отношении *S. epidermidis* и *E. coli* была незначительной. Активные штаммы были представлены грамположительными бактериями родов *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Terribacillus*, *Virgibacillus* (тип *Firmicutes*), *Streptomyces*, *Pseudonocardia*, *Cellulosimicrobium*, *Nocardiopsis* (*Actinobacteria*) и в меньшей степени грамотрицательными бактериями *Shewanella*, *Psychrobacter*, *Pseudoalteromonas* (класс *Gammaproteobacteria*), *Massilia* (класс *Betaproteobacteria*) и *Arenibacter* (тип *Bacteroidetes*). Наиболее активные штаммы (табл. 1) были исследованы на наличие генов синтеза вторичных метаболитов: поликетидсинтаз (PKS-1) и нерибосомных пептидсинтаз (NRPS) методом ПЦР с использованием вырожденных праймеров. Фрагменты гена NRPS были обнаружены в 10 штаммах следующих родов: *Shewanella* (Ch7, Ch18, Ch58), *Loktanella* (Ch44), *Aeromicrobium* (Ch48), *Virgibacillus* (Ch61), *Cellulosimicrobium* (Ch75), *Streptomyces* (Ch85) и *Paenibacillus* (Ch162, Ch186) (рис. 4). Фрагменты гена PKS-1 присутствовали в 16 штаммах родов *Shewanella* (Ch3), *Arenibacter*

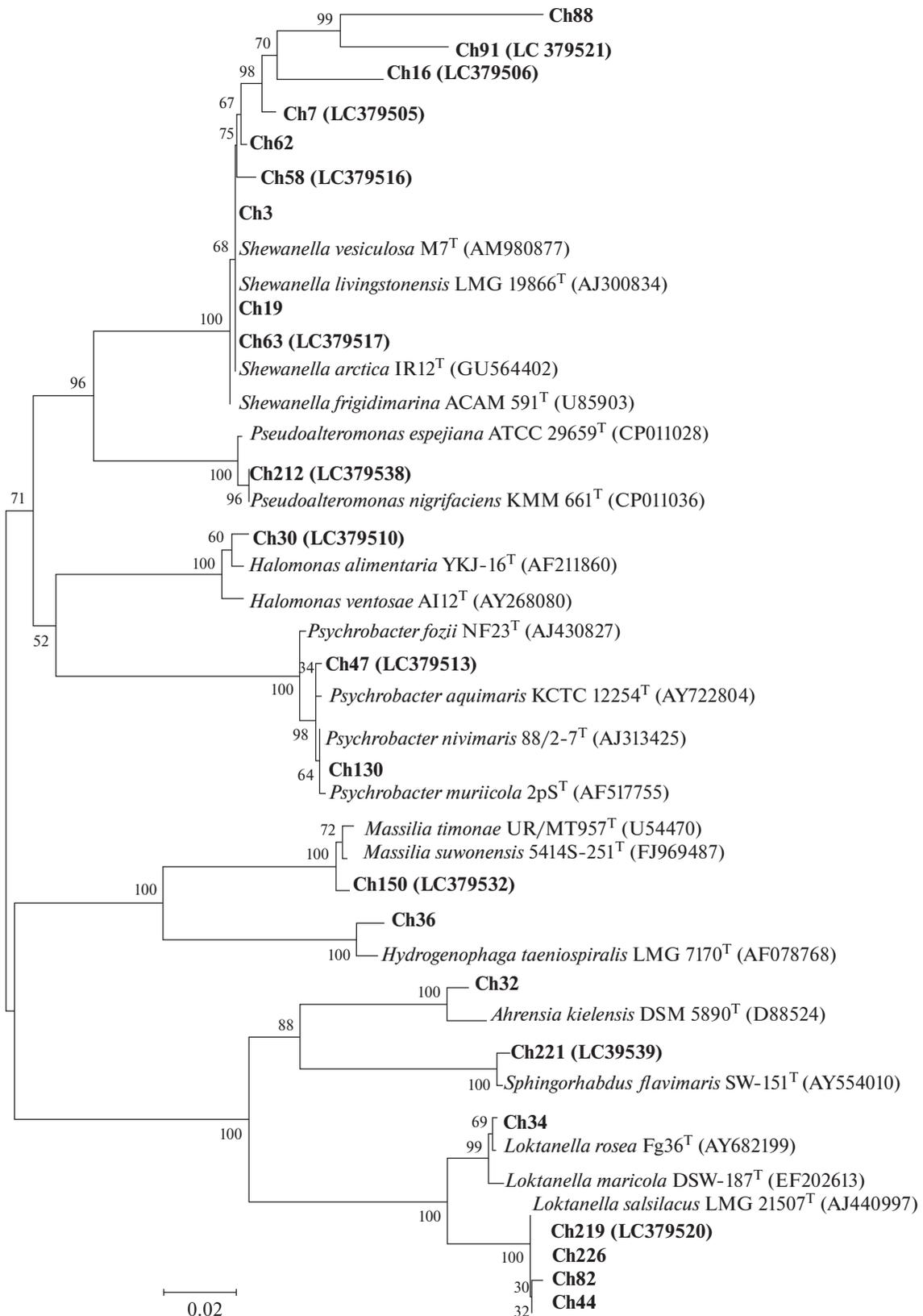


Рис. 1. Филогенетическое дерево бактерий, изолированных из донных осадков Чукотского моря, отнесенных к типу *Proteobacteria*. Здесь и на рис. 2 и 3: филогенетическое дерево построено на основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК с использованием алгоритма neighbor-joining; статистическую достоверность ветвления оценивали с помощью bootstrap-анализа 1000 альтернативных деревьев. Масштаб соответствует двум нуклеотидным заменам на 100 нуклеотидов.

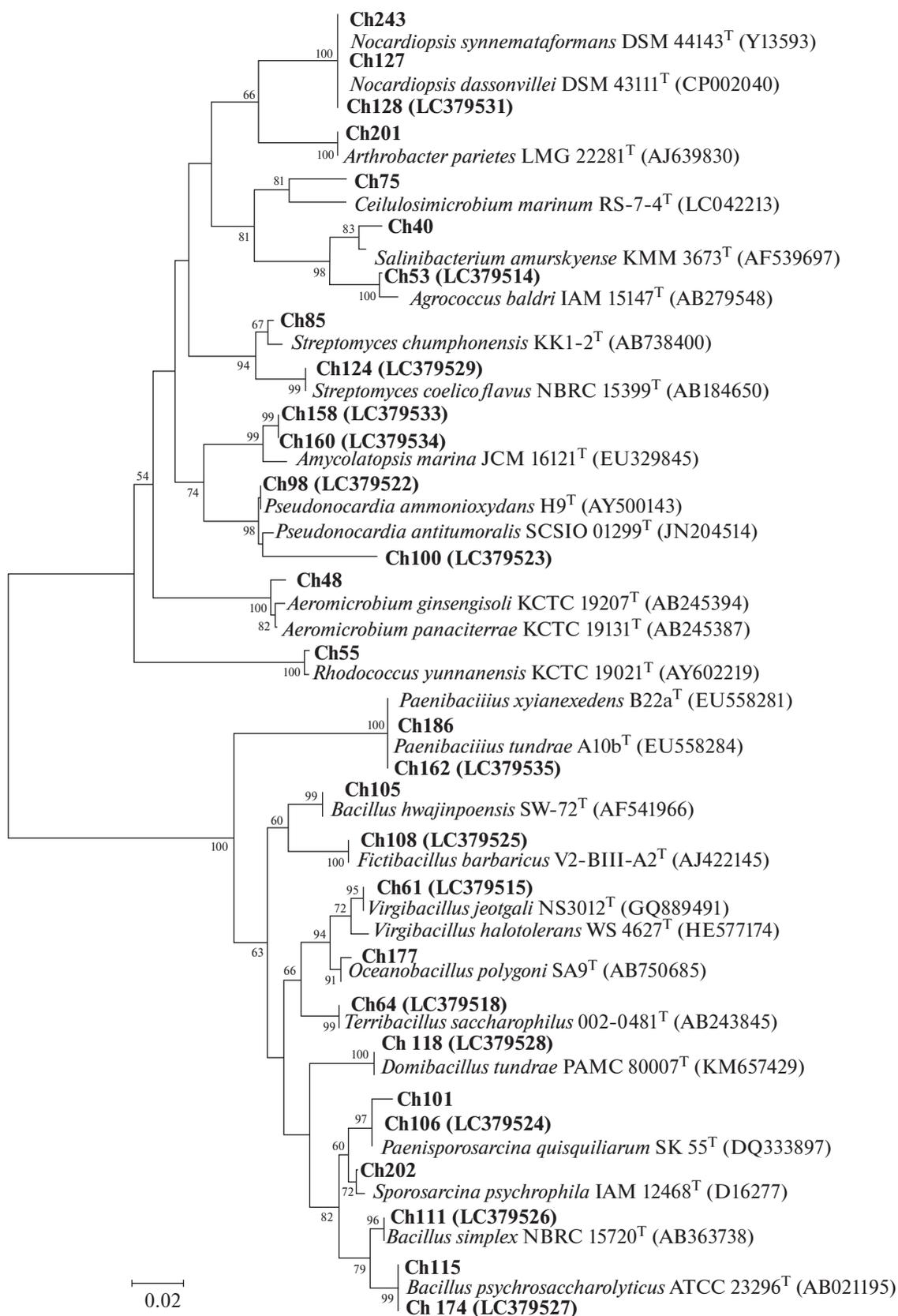


Рис. 2. Филогенетическое дерево представителей *Actinobacteria* и *Firmicutes*, выделенных из донных осадков Чукотского моря. Масштаб соответствует двум нуклеотидным заменам на 100 нуклеотидов.

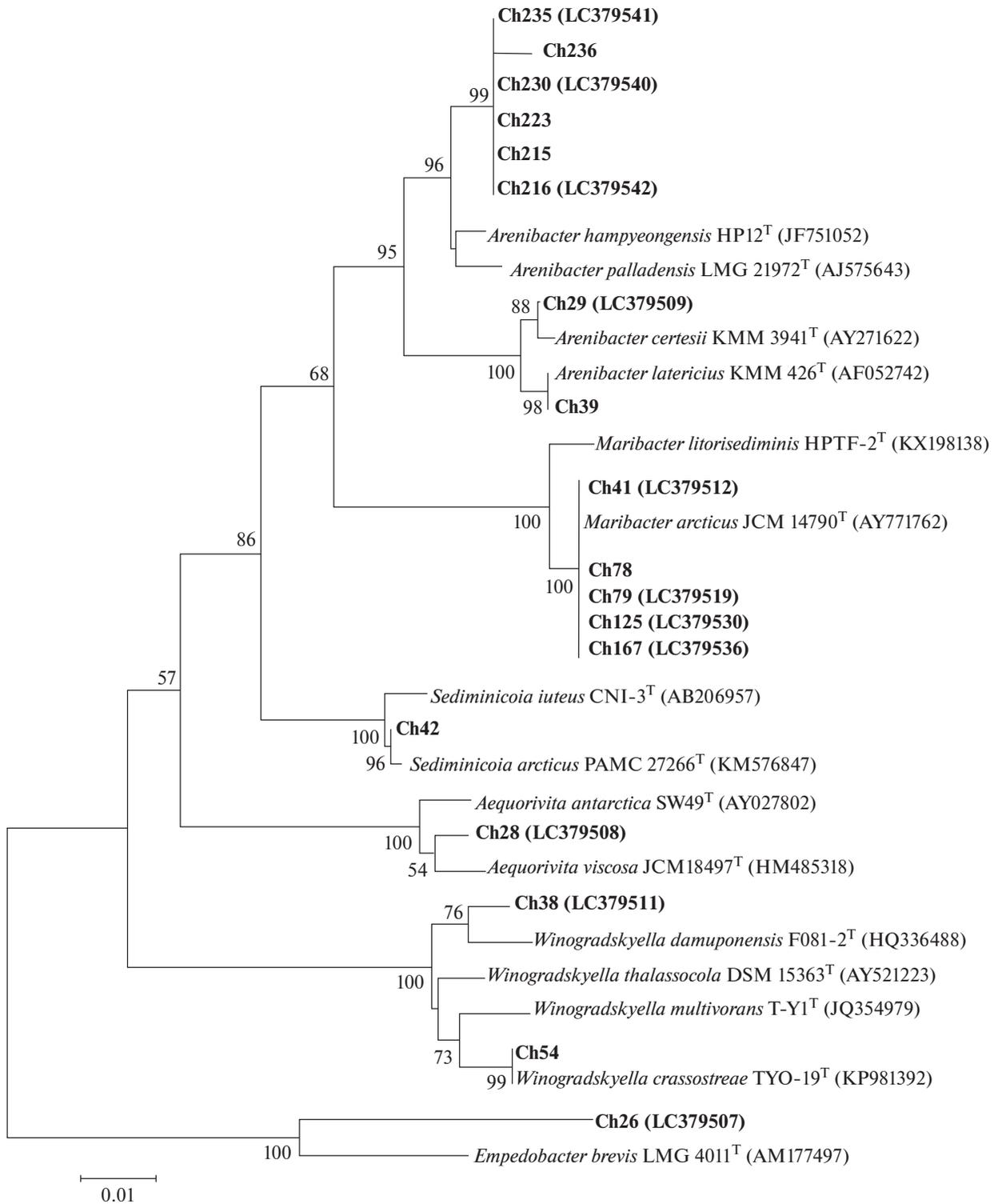


Рис. 3. Филогенетическое дерево штаммов *Bacteroidetes*, изолированных из донных осадков Чукотского моря. Масштаб соответствует одной нуклеотидной замене на 100 нуклеотидов.

(Ch39, Ch216, Ch223, Ch235), *Loktanella* (Ch44), *Mas-silia* (Ch150), *Virgibacillus* (Ch61), *Terribacillus* (Ch64), *Bacillus* (Ch111), *Streptomyces* (Ch124), *Oceanobacil-lus* (Ch177), *Amycolatopsis* (Ch158, Ch160), *Paeniba-cillus* (Ch162) и *Nocardioopsis* (Ch243) (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты по таксономическому составу бактерий донных осадков Чукотского моря согласуются с результатами исследований микроорганизмов донных осадков, полученных

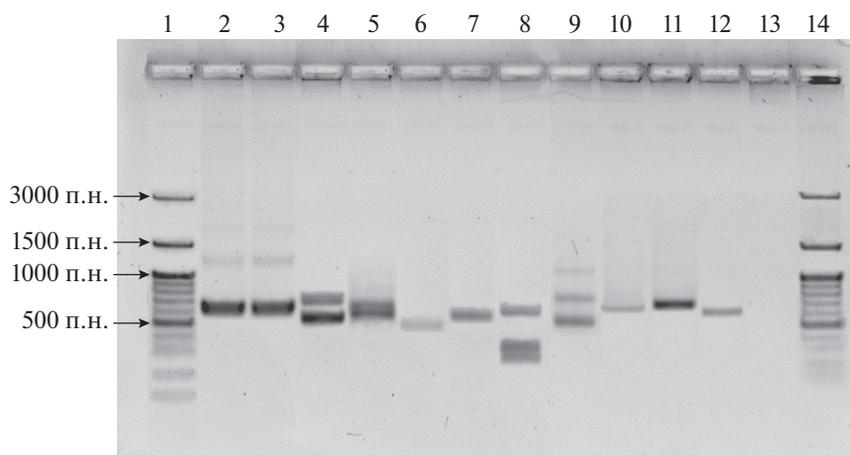


Рис. 4. Обнаружение фрагментов генов NRPS в ДНК активных штаммов методом ПЦР. Штаммы бактерий: 2 – Ch7; 3 – Ch18; 4 – Ch44; 5 – Ch48; 6 – Ch58; 7 – Ch61; 8 – Ch75; 9 – Ch85; 10 – Ch162; 11 – Ch186; 12 – *Sphingomonas molluscorum* КММ 3882^T (положительный контроль); 13 – отрицательный контроль; 1, 14 – ДНК маркер (от 100 до 3000 п.н.). Стрелками указаны размеры фрагментов маркерной ДНК.

при использовании молекулярных методов на основе ПЦР-амплификации и создании библиотек клонов генов 16S рРНК и/или культуральных методов анализа (Li et al., 2009; Kouridakis et al., 2010). Показано, что *Gammaproteobacteria* и грамположительные бактерии с высоким содержанием Г + Ц были доминантными группами в микробных сообществах донных осадков двух заливов Японского моря (Urakawa et al., 1999). В исследовании Сюй с соавторами (Xu et al., 2008) *Gammaproteobacteria* (22.8%) и *Alphaproteobacteria* (16.5%) преобладали среди бактерий донных осадков северо-восточной части Тихого океана. При изучении бактерий донных осадков Японского моря были обнаружены *Proteobacteria* (38%), *Firmicutes* (27%), *Actinobacteria* (21%) и *Bacteroidetes* (14%) (Romanenko et al., 2013a). Следует отметить, что бактерии семейства *Flavobacteriaceae*, представители которого широко распространены в морской среде, часто выделяются из образцов донных осадков (Alonso et al., 2007).

В процессе скрининга было выявлено 40 штаммов с антимикробной активностью, большинство из них относятся к типам *Firmicutes* (*Bacillus*, *Paenibacillus*, *Terribacillus*, *Virgibacillus*) и *Actinobacteria* (*Streptomyces*, *Pseudonocardia*, *Cellulosimicrobium*, *Nocardioopsis*). Штаммы *Proteobacteria* и *Bacteroidetes* были менее активны. Анализ литературных данных и собственные исследования показывают, что многие представители родов *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Streptomyces* и *Nocardioopsis* являются штаммами-антагонистами и служат продуцентами БАВ с антимикробными свойствами (Bull, Stach, 2007; Romanenko et al., 2013b). Юань с соавторами (Yuan et al., 2014) изучали родовой состав и активность штаммов *Actinobacteria*, изолированных из образцов донных осадков Чукотского моря (Канадский бассейн) в летний период 2010 г. Среди выделенных актинобактерий были идентифицированы штаммы 14 родов, в том числе *Arsenicicoccus*, *Citricoccus*, *Kocuria* и *Saccharopolyspora*, а также

редко обнаруживаемый в морской среде род *Microlunatus*; антимикробную активность показали штаммы *Streptomyces*, *Nocardioopsis* и *Microlunatus* (Yuan et al., 2014). В нашем исследовании мы не обнаружили штаммов из пяти указанных выше родов актинобактерий, но штаммы *Streptomyces* и *Nocardioopsis* были также наиболее активными и ингибировали рост наибольшего числа индикаторных микроорганизмов. Активными были штаммы *Amycolatopsis* и *Cellulosimicrobium*, но показали ограниченный спектр антимикробной активности. Сведения об антимикробной активности бактерий родов *Shewanella* и *Psychrobacter* очень ограничены и отсутствуют для штаммов *Arenibacter* (тип *Bacteroidetes*). Мы не обнаружили данных по антимикробной активности бактерий *Shewanella*, выделенных из морских донных осадков, а также об активности шеванелл, входящих в кластер *S. vesiculosa*/*S. frigidimarina*. Показано, что штаммы *Shewanella* с антимикробной активностью присутствуют в микробных сообществах, ассоциированных с морскими беспозвоночными, где представлены видами *S. baltica* и *S. putrefaciens* (см.: Heindl et al., 2010; Pham et al., 2016).

Многие биологически активные метаболиты морских бактерий относятся к двум разнообразным классам соединений: поликетиды (ПК) и нерибосомные пептиды (НРП), которые конструируются с помощью мультимодулярных ферментов поликетидсинтаз (PKS) и нерибосомных пептидсинтаз (NRPS) (см.: Williams, 2013). Показано, что бактерии из морских источников синтезируют около 70% НРП, которые обладают антимикробным, противовирусным, цитостатическим, противомаларийным или противопаразитарным действием, а также используются как стимуляторы роста животных и природные инсектициды (Agrawal et al., 2017). Анализ литературных данных свидетельствует о том, что метод ПЦР-скрининга генов PKS и NRPS используется для исследова-

Таблица 1. Антимикробная активность бактерий, выделенных из донных осадков Чукотского моря

Штамм	Филогенетически близкий вид	Сходство, %	Зона ингибирования роста, мм						Фрагменты гена	
			<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Xanthomonas sp. pv. badrii</i>	<i>Candida albicans</i>	NRPS
Ch3	<i>Shewanella livingstonensis</i>	98	12	14	14	W*	12	-	-	+
Ch7	<i>Shewanella vesiculosa</i>	98	12	15	15	15	12	-	-	-
Ch18	<i>Shewanella vesiculosa</i>	98	20	15	-	W	-	18	15	-
Ch39	<i>Arenibacter latericius</i>	98	-	-	-	12	-	14	-	+
Ch44	<i>Loktanella salsilacus</i>	98	W	12	12	-	-	-	+	+
Ch48	<i>Aeromicrobium ginsengisoli</i>	98	W	12	-	W	-	-	+	-
Ch58	<i>Shewanella arctica</i>	99	15	15	-	12	-	20	W	-
Ch61	<i>Virgibacillus jeotgali</i>	97	12	12	-	12	-	12	-	+
Ch64	<i>Terribacillus goriensis</i>	96	W	W	-	20	-	12	-	+
Ch75	<i>Cellulosimicrobium marinum</i>	97	15	30	-	20	-	12	-	-
Ch85	<i>Streptomyces chumphonensis</i>	98	28	32	W	35	-	30	+	-
Ch111	<i>Bacillus simplex</i>	99	-	W	-	-	-	15	W	+
Ch124	<i>Streptomyces coelicoflavus</i>	99	20	32	15	22	-	16	-	+
Ch150	<i>Massilia timonae</i>	99	15	28	-	W	-	W	-	+
Ch158	<i>Amycolatopsis marina</i>	97	22	-	-	14	-	12	-	+
Ch160	<i>Amycolatopsis marina</i>	97	14	12	-	-	-	12	-	+
Ch162	<i>Paenibacillus tundrae</i>	99	W	-	-	20	-	12	+	+
Ch177	<i>Oceanobacillus polygoni</i>	99	-	W	-	14	-	15	-	+
Ch186	<i>Paenibacillus tundrae</i>	99	W	-	-	W	-	12	+	+
Ch216	<i>Arenibacter hampyeongensis</i>	98	W	15	W	12	-	20	-	+
Ch223	<i>Arenibacter hampyeongensis</i>	98	-	W	-	15	-	12	-	+
Ch235	<i>Arenibacter hampyeongensis</i>	98	-	-	-	W	-	15	-	+
Ch243	<i>Nocardopsis dassonvillei</i>	99	14	32	-	15	-	15	-	+

*W – слабая активность; зона ингибирования наблюдалась как зона уменьшения роста индикаторного штамма.

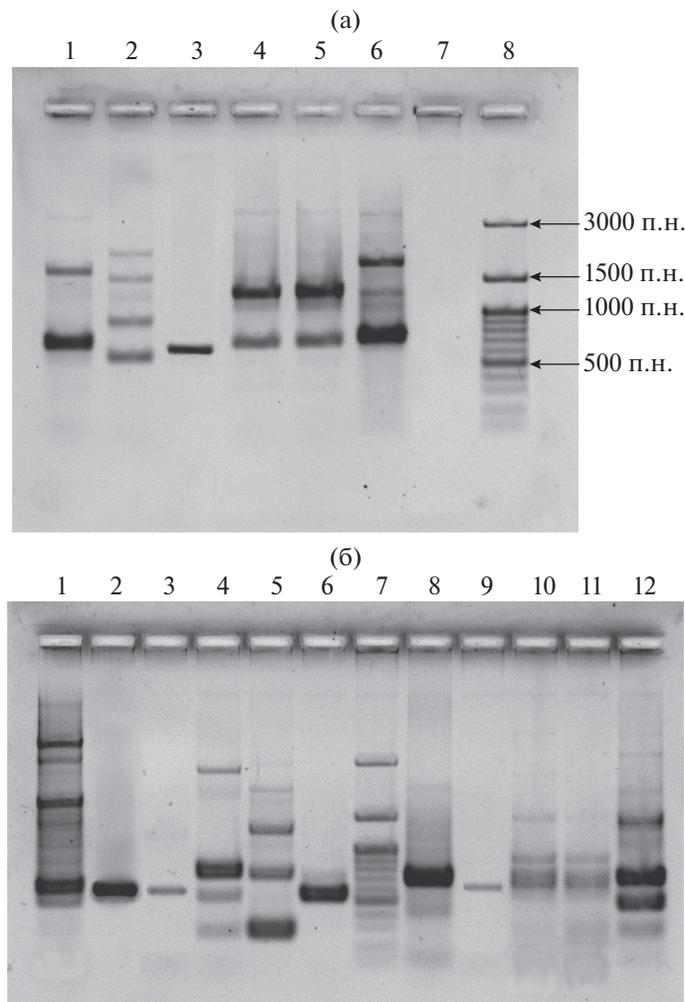


Рис. 5. Обнаружение фрагментов генов PKS-1 в ДНК активных штаммов методом ПЦР. Штаммы бактерий: а) 1 – Ch243; 2 – Ch177; 3 – Ch216; 4 – Ch223; 5 – Ch235; 6 – *Paenibacillus profundus* КММ 9420^T (положительный контроль); 7 – отрицательный контроль; 8 – ДНК маркер (от 100 до 3000 п.н.). Стрелками указаны размеры фрагментов маркерной ДНК. б) 1 – Ch3; 2 – Ch39; 3 – Ch44; 4 – Ch61; 5 – Ch64; 6 – Ch111; 7 – ДНК маркер (от 100 до 3000 п.н.); 8 – Ch124; 9 – Ch150; 10 – Ch158; 11 – Ch160; 12 – Ch162.

ния потенциальной способности микроорганизмов различных таксономических групп синтезировать ПК и НРП. ПЦР-скрининг показал наличие генов PKS-1 и/или NRPS в 23 активных штаммах, что подтверждает возможность исследуемых штаммов синтезировать вещества поликетидной природы и нерибосомные пептиды. Для дальнейшего исследования планируется выделение метаболитов, продуцируемых активными штаммами, установление их химической структуры и изучение биологической активности.

Настоящее исследование вносит вклад в изучение биоразнообразия и антимикробной активности культивируемых микроорганизмов донных осадков Чукотского моря. Проведенное исследование показывает, что донные осадки Чукотского моря могут служить источником выделения новых таксонов морских бактерий и штаммов-продуцентов антимикробных веществ.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность участникам экспедиционного рейса № 48 НИС «Академик Опарин» и лично научному сотруднику А.А. Белику за помощь в отборе проб донных осадков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Agrawal S., Acharya D., Adholeya A. et al. Nonribosomal Peptides from Marine Microbes and Their Antimicrobial and Anticancer Potential // Front. Pharmacol.

2017. V. 8. P. 828.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00828>
- Alonso C., Warnecke F., Amann R., Pernthaler J. High local and global diversity of flavobacteria in marine plankton // Environ. Microbiol. 2007. V. 9. № 5. P. 1253–1266.
- Bhatnagar I., Kim S.K. Pharmacologically prospective antibiotic agents and their sources: A marine microbial perspective // Environ. Toxicol. Pharmacol. 2012. V. 34. № 3. P. 631–643.
- Bull A.T., Stach J.E.M. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery // Trends in Microbiology. 2007. V. 15. № 11. P. 491–499.
- Debbab A., Aly A.H., Lin W.H., Proksch P. Bioactive Compounds from Marine Bacteria and Fungi // Microb. Biotech. 2010. V. 3. № 5. P. 544–563.
- Heindl H., Wiese J., Thiel V., Imhoff J.F. Phylogenetic diversity and antimicrobial activities of bryozoan-associated bacteria isolated from Mediterranean and Baltic Sea habitats // Syst. Appl. Microbiol. 2010. V. 33. № 2. P. 94–104.
- Kim O.S., Cho Y.J., Lee K. et al. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2012. V. 62. P. 716–721.
- Kouridaki I., Polymenakou P.N., Tselepidis A. et al. Phylogenetic diversity of sediment bacteria from the deep Northeastern Pacific Ocean: a comparison with the deep Eastern Mediterranean Sea // Int. Microbiol. 2010. V. 13. № 3. P. 143–150.
- Lauro F.M., Bartlett D.H. Prokaryotic lifestyles in deep sea habitats // Extremophiles. 2008. V. 12. P. 15–25.
- Li H., Yu Y., Luo W. et al. Bacterial diversity in surface sediments from the Pacific Arctic Ocean // Extremophiles. 2009. V. 13. № 2. P. 233–246.
- Penesyan A., Kjelleberg S., Egan S. Development of novel drugs from marine surface associated microorganisms // Mar. Drugs. 2010. V. 8. P. № 3. 438–459.
- Pettit R.K. Culturability and secondary metabolite diversity of extreme microbes: expanding contribution of deep sea and deep-sea vent microbes to natural product discovery // Mar. Biotechnol. 2011. V. 13. P. 1–11.
- Pham T.M., Wiese J., Wenzel-Storjohann A., Imhoff J.F. Diversity and antimicrobial potential of bacterial isolates associated with the soft coral *Alcyonium digitatum* from the Baltic Sea // ResearchGate, in Antonie van Leeuwenhoek. 2016. V. 109. № 1. P. 105–119.
- Romanenko L.A., Uchino M., Kalinovskaya N.I., Mikhailov V.V. Isolation, phylogenetic analysis and screening of marine mollusc-associated bacteria for antimicrobial, hemolytic and surface activities // Microbiol. Res. 2008. V. 163. № 6. P. 633–644.
- Romanenko L.A., Tanaka N., Kalinovskaya N.I., Mikhailov V.V. Antimicrobial potential of deep surface sediment associated bacteria from the Sea of Japan // WJMB. 2013a. V. 29. P. 1169–1177.
- Romanenko L.A., Tanaka N., Svetashev V.I., Kalinovskaya N.I. *Paenibacillus profundus* sp. nov., a deep sediment bacterium that produces isocoumarin and peptide antibiotics // Arch. Microbiol. 2013b. V. 195. P. 247–254.
- Romanenko L.A., Kurilenko V.V., Guzev K.V. et al. *Winoogradskyella profunda* sp. nov. isolated from the Chukchi Sea bottom sediments // Arch. Microbiol. 2019. V. 201. № 1. P. 45–50.
- Santos O.C.S., Soares A.R., Machado F.L.S. et al. Investigation of biotechnological potential of sponge-associated bacteria collected in Brazilian coast // Lett. Appl. Microbiol. 2015. V. 60. № 2. P. 140–147.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 // Mol. Biol. Evol. 2013. V. 30. № 12. P. 2725–2729.
- Urakawa H., Kita-Tsukamoto K., Ohwada K. Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis // Microbiology. 1999. V. 145. P. 3305–3315.
- Williams G. Engineering polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases // Curr. Opin. Struct. Biol. 2013. V. 23. № 4. P. 603–612.
- Xu H., Wu M., Wang X. et al. Bacterial diversity in deep-sea sediment from northeastern Pacific Ocean // Acta Ecologica Sinica. 2008. V. 28. № 2. P. 479–485.
- Yuan M., Yu Y., Li H.R. et al. Phylogenetic diversity and biological activity of *Actinobacteria* isolated from the Chukchi shelf marine sediments in the Arctic Ocean // Mar. Drugs. 2014. V. 12. № 3. P. 1281–1297.

Biodiversity and Antimicrobial Activity of Bacteria Isolated from the Bottom Sediments of the Chukchi Sea

L. A. Romanenko^a, V. V. Kurilenko^a, N. Yu. Chernysheva^a, K. V. Guzev^a, and V. V. Mikhailov^{a, b}

^aG.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690022, Russia

^bFar-Eastern Federal University, Vladivostok 690950, Russia

Two hundred and forty-eight strains of heterotrophic microorganisms were isolated from bottom sediments of the Chukchi Sea. 16S rRNA gene sequence analysis was used to classify representatives of 33 genera belonging to the phyla *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, and *Actinobacteria*. Phylogenetic analysis showed that at least eight bacterial groups displayed 97–98% similarities of 16S rRNA gene sequence and can represent novel taxa. Screening of the antimicrobial activity revealed 40 strains, capable to inhibit growth of two or more indicator microorganisms. Active strains were represented by bacteria of the genera *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Terribacillus*, *Virgibacillus* (phylum *Firmicutes*), *Streptomyces*, *Pseudonocardia*, *Nocardiopsis* (*Actinobacteria*) and, in less degree, by gram-negative bacteria *Shewanella*, *Psychrobacter* (class *Gammaproteobacteria*), *Massilia* (class *Betaproteobacteria*) and *Arenibacter* (phylum *Bacteroidetes*). Detection of gene fragments of polyketide synthase (PKS-1) and non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) by PCR method using degenerate primers in 23 strains suggests that the bacteria studied can serve as a source of biologically active metabolites relating to polyketides and/or non-ribosomal peptides.

Keywords: bacteria, phylogeny, 16S rRNA gene, PKS-1, NRPS, antimicrobial activity, bottom sediments, the Chukchi Sea

УДК 579.68:57.063

ВИБРИОФЛОРА ГИДРОБИОНТОВ И ВОДЫ ЗАЛИВОВ ПЕТРА ВЕЛИКОГО (ЯПОНСКОЕ МОРЕ) И НЯЧАНГ (ЮЖНО-КИТАЙСКОЕ МОРЕ)

© 2020 г. И. А. Беленева*

Национальный научный центр морской биологии (ННЦМБ) им. А.В. Жирмунского ДВО РАН,
Владивосток 690041, Россия

*e-mail: beleneva.vl@mail.ru

Поступила в редакцию 10.06.2019 г.

После доработки 02.10.2019 г.

Принята к публикации 03.10.2019 г.

Из проб воды и гидробионтов умеренной и тропической климатических зон выделено и фенотипически охарактеризовано 173 и 124 штамма *Vibrio* spp. соответственно. Идентификация проведена на основе расширенного анализа фенотипических свойств, что позволило выявить ранее не диагностированные виды. В зал. Петра Великого преобладали *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* и *V. splendidus*. Впервые сообщается о выделении *V. harveyi* из гидробионта умеренных вод зал. Петра Великого. Установлено более высокое видовое разнообразие вибрионов в тропической зоне по сравнению с таковым в умеренной зоне. Вибрионы из зал. Петра Великого были менее устойчивы к исследованному спектру антибиотиков, чем вибрионы из тропической зоны. Вьетнамский изолят *V. vulnificus* показал устойчивость к максимальному числу антибиотиков (к 12 из 15).

Ключевые слова: *Vibrio*, Японское море, залив Нячанг, устойчивость к антибиотикам

DOI: 10.31857/S0134347520050034

Ви́брионы, принадлежащие к классу Gammaproteobacteria семейства Vibrionaceae согласно анализу генов 16S rRNA, являются одними из самых распространенных в морской среде бактерий. Они обитают во всех районах Мирового океана как в свободноживущей форме, так и в ассоциациях с планктонными организмами, рыбами, моллюсками, иглокожими, водорослями, губками, кораллами и другими гидробионтами, населяя их органы и ткани (Thompson et al., 2004; Gomes-Gil et al., 2014). Известны симбиотические ассоциации между *Vibrio fischeri*, *V. logei* и кальмарами *Sepiolla* spp. Установлено, что *V. rotiferianus*, выделенный из культуры коловраток, положительно влияет на здоровье этих животных (Gomez-Gil et al., 2003). Существуют прочные симбиотические взаимоотношения между *V. haliotocoli* и брюхоногими моллюсками (Sawabe, 2006). Бактерии синтезируют большое количество органических кислот, которые используются морскими ушками в качестве источника энергии или предшественника для синтеза белка. Наблюдается прямая зависимость между ассоциированной микрофлорой и состоянием культивируемых устриц (Clerissi et al., 2018): чем стабильнее и разнообразнее состав микрофлоры, тем благополучнее их состояние.

Ви́брионы *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. vulnificus* и *V. parahaemolyticus* представляют бóльшую опасность для человека по сравнению с вибрионами *V. alginolyticus*, *V. cincinnatiensis*, *V. fluvialis*, *V. furnisii*, *V. harveyi* и *V. metschnikovii* (Gomes-Gil et al., 2014). Основными патогенами в аквакультуре являются *V. anguillarum*, *V. salmonicida*, *V. vulnificus* и *V. harveyi* (см.: Thompson et al., 2004). Ви́брионы вызывают заболевания у диких и культивируемых гидробионтов во всех регионах Мирового океана, нанося огромный экономический ущерб (Rivera-Posada et al., 2011; Gomes-Gil et al., 2014).

В организме здоровых креветок было обнаружено около 30 видов вибрионов, в том числе патогенные *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* и *V. damsela*, однако в заболевших особях преобладали лишь один-два вида (Gomez-Gil et al., 1998). Наличие патогенных видов вибрионов в здоровых кораллах, а также снижение разнообразия вибриофлоры в заболевших колониях были выявлены при анализе микрофлоры склерактиний в Средиземном море (Rubio-Portillo et al., 2018). Это позволяет заключить, что не всегда выделение патогенного или условно-патогенного вида (видов) вибрионов из гидробионта представляет опасность. Мутации генов, кодирующих факторы патогенности, приводят к появлению

авирулентных штаммов. Кроме этого, многие важные факторы патогенности, как и лекарственная резистентность, ассоциированы с мобильными генетическими элементами, участвующими в горизонтальном переносе генов. Их потеря приводит к потере устойчивости к антибиотикам и способности вызывать заболевание (Hazen et al., 2010). В отличие от клинических изолятов, большинство природных штаммов *V. parahaemolyticus* не являются патогенными (Su, Liu, 2007). В последнее время антибиотикоустойчивость у микроорганизмов приняла глобальный характер, что влечет за собой рост неблагоприятных последствий для человека. Широкое использование антибиотиков способствует распространению генов лекарственной резистентности. Однако устойчивость вибрионов к антибиотикам не всегда является следствием их широкого использования в аквакультуре, а может быть реакцией естественного отбора (Teo et al., 2000). Поэтому чрезвычайно важен постоянный контроль за циркулирующими в природной среде штаммами микроорганизмов, в частности вибрионов, которые способны нести гены множественной лекарственной резистентности и по сути являются их естественным резервуаром.

Распространению вибрионов в морской среде посвящено много работ (Thompson et al., 2004; Igbiosa, Okoh, 2008; Cano-Gomez et al., 2009; García-Aljaro et al., 2014). Однако информация о видовом разнообразии вибрионов в прибрежных водах российского Дальнего Востока, в частности в зал. Петра Великого, крайне скудна. Сведения о вибриофлоре в зал. Нячанг (Вьетнам) также весьма ограничены, хотя опубликованы данные о патогенных вибрионах, наносящих большой экономический ущерб аквакультуре в разных районах страны (Oanh et al., 2002; Dang et al., 2016).

Цель настоящего исследования — оценить видовое разнообразие и устойчивость к антибиотикам вибрионов в морской воде, а также ассоциированных с различными гидробионтами в зал. Петра Великого Японского моря и в зал. Нячанг Южно-Китайского моря.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Пробы воды в зал. Петра Великого (зал. Восток) Японского моря отбирали из поверхностного слоя (30–40 см) в июне–августе 2017 и 2018 гг., а в бухте Балка на Базе изучения морских млекопитающих (БИММ) и на акватории Приморского океанариума — один раз в месяц с 27.02.2013 г. по 14.01.2014 г. В зал. Восток образцы гидробионтов отбирали водолазы с глубины 3–10 м. Высевы на вибриофлору проводили из двустворчатых моллюсков *Crassostrea gigas*, *Crenomytilus grayanus*, *Spisula sachalinensis*, *Modiolus kurilensis*, *Mytilus trossulus* и *Mizuhopecten yessoensis*, голотурии *Apostichopus japonicus*, морских ежей *Strongylocentrotus interme-*

dius и *Mesocentrotus nudus*, морских звезд *Patiria pectinifera* и *Asterias amurensis*, асцидии *Halocynthia aurantium*, водорослей *Saccharina japonica*, *Desmarestia viridis*, *Fucus distichus* subsp. *evanescens*, *Ulva lactuca* и *Mazzaella japonica*, а также из морской травы *Zostera marina*. Всего в зал. Петра Великого было отобрано 20 проб воды и 66 образцов гидробионтов.

В Южно-Китайском море у берегов Вьетнама пробы воды отбирали из поверхностного слоя в ноябре и декабре 2017 г. в зал. Нячанг в бухте Дам Бай, в порту Кауда, а также на пяти станциях у южного побережья залива в районе Камрани и на пяти станциях у северного побережья в районе Нинь Хоа. Образцы гидробионтов в бухте Дам Бай отбирали на глубине до 4 м. Это были водоросли *Caulerpa lentillifera*, *Padina boryana*, *Sargassum* sp. и *Gracilaria salicornia*, устрицы *Magallana bilineata*, *Pinctada margaritifera*, *Saccostrea cucullata* и *Ostrea* sp., колониальная асцидия *Didemnum molle*, губка *Niphates olemda*, усонogie раки *Amphibalanus* spp., брюхоногие моллюски *Ergalatax* sp. и *Bursa granularis*, морская звезда *Culcita novaeguineae*, а также морской еж *Salmacis bicolor*. Всего в зал. Нячанг отобрано 14 проб воды и 55 образцов гидробионтов.

Содержание растворенного кислорода в воде оценивали с помощью портативного измерителя HI 9142 (Hanna Instruments, Italy), а соленость — ручного рефрактометра S/Mill-E 2442-W10 (Japan).

Бактерий выделяли в соответствии с описанными ранее методиками (Беленева и др., 2014). Культуры хранятся при температуре -85°C в криопробирках в морской воде с добавлением глицерина (30%), пептона (1%) и MgSO_4 (3–5 г/л) (среда “Difco”, США) в Музее гетеротрофных бактерий ННЦМБ ДВО РАН, а также в автоматической системе биобанкирования LiCONiC STC Compact ULT при -80°C в Морском биобанке ННЦМБ ДВО РАН. Фенотипическую характеристику изолятов проводили, как описано ранее (Беленева, Кухлевский, 2010; Беленева и др., 2014) и с применением тест-систем API 20E (“bioMérieux”, Франция) согласно Буллера (Buller, 2004). Штаммы идентифицировали с использованием дихотомических ключей (Noguerola, Blanch, 2008), а также дополнительных данных, приведенных в руководствах по определению бактерий (Buller, 2004; Gomes-Gil et al., 2014). Люминесценцию определяли визуально в темноте по свечению культуры бактерий, выращенных на среде Marine Broth 2216 (“Difco”, США), обогащенной 10% глицерина, в течение 12 ч при встряхивании на шейкере Excella E5 (США) при 130 об/мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика мест отбора проб воды и гидробионтов

В зал. Восток температура и соленость поверхностного слоя воды изменялись в пределах 15.8–24.6°C и 26.1–33.5‰, на глубине 5 м – 15.0–23.8°C и 29.7–33.9‰.

В зал. Нячанг в бухте Дам Бай в 20 м от берега соленость воды составляла 32‰, концентрация растворенного кислорода – 5.8 мг/л. В порту Кауда на таком же расстоянии от берега эти показатели составляли соответственно 32‰ и 5.3 мг/л. В южной части залива на станции (далее – ст.) 1 (район впадения реки в море) соленость воды составляла 14‰, а концентрация растворенного кислорода – 3.2 мг/л; на ст. 2 (хозяйство марикультуры) – соответственно 26‰ и 4.3 мг/л; на ст. 3 (морской пруд с рыбой в танках) – 28‰ и 3.7 мг/л; на ст. 4 (порт Камрань) – 32‰ и 2.6 мг/л; на ст. 5 (устье реки) – 6‰ и 3.6 мг/л. В северной части залива в районе Нинь Хоа на ст. 6 при отсутствии признаков хозяйственной деятельности соленость воды составляла 20‰, концентрация растворенного кислорода – 10.3 мг/л; на ст. 7 (у пирса) – соответственно 32‰ и 10.4 мг/л; на ст. 8 (кутовая часть залива, рыбацкий затон) – 4.0‰ и 6.2 мг/л; на ст. 9 (устье реки у моста) – 15‰ и 8.3 мг/л; на ст. 10 (пляж Зоклет) – 30‰ и 9.1 мг/л.

Видовое разнообразие и устойчивость к антибиотикам

Всего нами выделено и охарактеризовано 297 штаммов вибрионов, принадлежащих к 11 видам (табл. 1). Из проб воды и гидробионтов зал. Петра Великого выделено 173 штамма вибрионов (табл. 2). Наиболее распространенными были *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* и *V. splendidus* I биотипа, выявленные во всех видах исследованных гидробионтов и в морской воде. Штаммы *V. pomeroiyi*, входящего в группу *V. splendidus*, и *V. fluvialis* также были обнаружены в беспозвоночных животных и в воде. Из воды вибрионы выделяли с мая по ноябрь с пиком численности в июле и августе. Патогенные для человека вибрионы *V. harveyi* и *V. furnissii* были выявлены только в двустворчатых моллюсках и трепанге.

В зал. Нячанг из проб воды и гидробионтов выделено и фенотипически охарактеризовано 124 штамма вибрионов (табл. 3). В вибриофлоре, как и в зал. Петра Великого, преобладали *V. alginolyticus* и *V. parahaemolyticus*, однако видовое разнообразие вибрионов в тропической зоне было выше, чем в умеренной зоне. Здесь были отмечены виды, не встречавшиеся в зал. Петра Великого: *V. vulnificus*, *V. anguillarum*, *V. mimicus*, *V. agarivorans* и *V. splendidus* II биотипа. Патогенные вибрионы обнаружены как в воде, так и в гидробионтах. *V. anguillarum*

и *V. furnissii* были выявлены в пробах воды, отобранных в районе станций 2 и 3, расположенных в хозяйствах марикультуры у побережья Камрани, а *V. vulnificus* и *V. mimicus* – в пробах воды со ст. 8 у побережья Нинь Хоа. По одному штамму *V. harveyi* было выделено из проб воды, отобранных в бухте Дам Бай на станциях 1, 5, 8 и 9.

Сравнительный анализ антибиотикочувствительности показал, что в зал. Петра Великого вибрионы были менее устойчивы к исследованному спектру антибиотиков, чем в тропической зоне (табл. 4, 5). Так, к тетрациклину, ципрофлоксацину и гентамицину в зал. Петра Великого было устойчиво 24.9, 16.8 и 14.5% штаммов соответственно; устойчивость вьетнамских изолятов составляла 62.1, 50.0 и 46.0% штаммов соответственно. В умеренной зоне *V. parahaemolyticus* был устойчив к максимальному числу антибиотиков – к 8 из 15. В зал. Нячанг парагемолитические вибрионы, наряду с *V. fluvialis* и *V. vulnificus* были устойчивы к 10, 10 и 12 антибиотикам из 15 соответственно. В умеренной зоне все виды вибрионов были устойчивы к оксациллину, олеандомицину, а в тропиках – к ампициллину, оксациллину и карбенициллину. Вибрионы из зал. Петра Великого были чувствительны к цефтазидиму, ципрофлоксацину, хлорамфениколу, рифампицину и вибриостатическому агенту 0–129/150 мкг; вибрионы из зал. Нячанг – к хлорамфениколу, рифампицину и 0–129 /150 мкг.

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на огромную значимость вибрионов в патологии гидробионтов и человека, экологический контроль за их распространением в морской среде и устойчивостью к антимикробным факторам недостаточен. Идентификация вибрионов осложняется тем, что некоторые виды имеют почти идентичные последовательности 16S рРНК и сходные фенотипические признаки (Thompson et al., 2004; Rivera-Posada et al., 2011; Gomez-Gil et al., 2014). Например, *V. furnissii* трудно дифференцировать от *V. fluvialis* с помощью 16S рРНК, так как сравнение этих последовательностей показало их 100% сходство (Hashimoto et al., 2018). *V. cholerae* и *V. mimicus* фенотипически различаются только по отношению к сахарозе и по реакции Фогес–Проскауэра (West et al., 1986; Gomez-Gil et al., 2014). Методы идентификации вибрионов постоянно совершенствуются. Из-за схожести фенотипов близкородственных видов общепринятые короткие схемы дифференциации имеют серьезные недостатки. Кроме того, некоторые подвижные генетические элементы являются причиной фенотипической гетерогенности, так как несут дополнительные фенотипические характеристики (Hazen et al., 2010).

Таблица 1. Фенотипические свойства изолятов

Характеристика	V. alg	V. para	V. vuln	V. harv	V. furn	V. fluv	V. spl		V. pom	V. agar	V. ang	V. mim
							I	II				
β-галактозидаза	—	—	+	v	+	+	+	—	+	+	+	+
Аргининдигидролаза	—	—	—	—	+	+	+	—	+	—	+	—
Лизиндекарбоксилаза	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	+
Орнитиндекарбоксилаза	v*	+	v	+	—	—	—	—	—	—	—	+
Утилизация цитратов	—	v	v	—	+	+	v	v	—	—	+	—
H ₂ S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Уреаза	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
Триптофандеаминаза	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Продукция индола	v	+	+	+	—	v	+	—	+	—	+	+
Фогес–Проскауэр	v	v	—	—	—	—	v	—	v	—	+	—
Желатиназа	v	v	+	+	+	v	+	v	+	—	+	+
Глюкоза	+	+	+	+	+газ	+	+	+	+	+	+	+
Маннит	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+
Инозит	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
Сорбит	—	—	—	v	—	v	—	—	+	—	+	—
Рамноза	—	—	—	—	v	—	—	—	—	—	—	—
Сахароза	+	—	—	+	+	+	+	—	—	—	+	—
Мелибиоза	—	—	—	—	—	—	+	—	+	+	—	—
Амигдалин	—	+	+	+	—	+	—	—	—	—	+	—
Арабиноза	—	v	—	—	+	+	—	—	—	—	v	—
Цитохромоксидаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TCBS агар**	ж	зел	зел	ж	ж	ж	ж	зел	зел	зел	ж	зел
NO ₃ ⁻ редукция	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Кислота из арбутина	—	—	+	+	—	+	—	—	—	—	—	+
Утилизация:												
лейцин	+	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—
путресцин	v	+	—	—	+	v	—	—	—	—	—	—
этанол	—	+	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
Рост на NaCl:												
0%	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	+
6%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
8%	+	+	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—
10%	+	v	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Агараза	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—
Амилаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v	+	—

*Признак варьирующ у разных штаммов.

**Бактерии при росте на этой среде формируют желтые (ж) или зеленые (зел) колонии.

Примечание. Первые 21 характеристики даны по результатам тест-системы API 20 E; V. alg – *V. alginolyticus*, V. para – *V. parahaemolyticus*, V. vuln – *V. vulnificus*, V. harv – *V. harveyi*, V. furn – *V. furnissii*, V. fluv – *V. fluvialis*, V. spl – *V. splendidus*, V. pom – *V. pomeroyi*, V. agar – *V. agarivorans*, V. ang – *V. anguillarum*, V. mim – *V. mimicus*.

Для дифференциации видов вибрионов рекомендовано включить следующие тесты: продукция кислоты из арбутина и салицина, а также использование L-лейцина, путресцина и этанола, являющегося источником углерода (West et al., 1986). В то же время применение слишком боль-

шого числа дополнительных тестов не всегда эффективно, трудозатратно и дорого (Alcaide, 2003). В руководстве Буллера (Buller, 2004) подтверждена адекватность использования тест-системы API-20E для идентификации вибрионов. Применение усовершенствованных схем и методик

Таблица 2. Источник выделения штаммов *Vibrio* spp. в зал. Петра Великого

Объект	<i>N</i>	<i>V. alginolyticus</i> (110)	<i>V. parahaemolyticus</i> (29)	<i>V. harveyi</i> (2)	<i>V. furnissii</i> (1)	<i>V. fluvialis</i> (8)	<i>V. splendidus</i> (20)	<i>V. pomeroyi</i> (3)
Двустворчатые моллюски:								
<i>Crassostrea gigas</i>	5	5	2	—	1	2	3	—
<i>Crenomytilus grayanus</i>	5	4	3	—	—	1	5	—
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	5	5	2	—	—	2	—	—
<i>Modiolus kurilensis</i>	5	4	1	—	—	—	—	—
<i>Mytilus trossulus</i>	5	5	1	—	—	—	—	—
<i>Spisula sachalinensis</i>	5	3	1	—	—	—	2	—
Голотурии:								
<i>Apostichopus japonicus</i>	3	7	2	2	—	—	—	1
Морские ежи:								
<i>Mesocentrotus nudus</i>	3	4	2	—	—	—	3	1
<i>Strongylocentrotus intermedius</i>	3	3	1	—	—	—	—	—
Морские звезды:								
<i>Asterias amurensis</i>	3	3	2	—	—	—	—	—
<i>Patiria pectinifera</i>	3	3	2	—	—	—	—	—
Асцидии:								
<i>Halocynthia aurantium</i>	3	5	1	—	—	—	—	—
Водоросли:								
<i>Desmarestia viridis</i>	3	3	—	—	—	—	—	—
<i>Fucus distichus</i>	3	5	—	—	—	—	—	—
<i>Gracilaria verrucosa</i>	3	4	—	—	—	—	4	—
<i>Saccharina japonica</i>	3	4	—	—	—	—	—	—
<i>Mazzaella japonica</i>	3	2	—	—	—	—	—	—
Морская трава:								
<i>Zostera marina</i>	3	7	3	—	—	—	—	—
Морская вода	20	34	6	—	—	3	3	1

Примечание. Здесь и в табл. 3: в скобках — количество выделенных штаммов; *N* — количество экземпляров и проб воды.

идентификации на основе характеристики фенотипа позволило нам расширить спектр видов вибрионов, обитающих в умеренных водах зал. Петра Великого, а также выявить не обнаруженные ранее виды (*V. harveyi*). Дифференцировали виды *V. harveyi* и *V. alginolyticus* по ряду признаков: по наличию уреазы, способности к росту при 10% NaCl в среде и по реакции Фогес–Проскауэра (Buller, 2004). Кроме этого, из 11 штаммов *V. harveyi* 9 обладали люминесценцией.

В опубликованных работах, посвященных изучению вибриофлоры дальневосточных морей, идентификация вибрионов проведена, как правило, до уровня рода; авторы ограничиваются данными о численности вибриофлоры в разных морских объектах и о ее сезонных колебаниях (Богатыренко, Бузолева, 2016). Известно о широком распространении *V. alginolyticus* и *V. parahaemolyticus* (см.: Лаженцева, 2012). При этом информация о других видах вибрионов отсутствует либо вызывает сомнение. Так, анализ патогенной микрофлоры камчатского краба выявил наличие

V. vulnificus (см.: Пугаева и др., 2002), однако диагностика патогена, на наш взгляд, была проведена не в полной мере, чтобы определить его до уровня вида. Наши данные о преобладании *V. alginolyticus* и *V. parahaemolyticus* в зал. Петра Великого совпадают с результатами изучения распространения галофильных вибрионов (Лаженцева, 2012) и подтверждают предыдущие результаты (Беленева и др., 2004). Следует отметить, что *V. alginolyticus* в воде обнаруживали чаще, чем *V. parahaemolyticus* (30.6 и 20.6% штаммов соответственно), последний вид обычно находили в гидробионтах.

Установлено, что *V. splendidus* I биотипа является третьим по распространению видом вибрионов в зал. Петра Великого, при этом в зал. Нячанг выделяли *V. splendidus* II биотипа и не выделяли *V. splendidus* I биотипа. Из дальневосточного тропанга *A. japonicus* нами выделен *V. harveyi*. Ранее о его находках в зал. Петра Великого не сообщалось. Обычно *V. harveyi* выделялся в тропических и субтропических водах; считают, что этот вид

Таблица 3. Источник выделения штаммов *Vibrio* spp. в зал. Нячанг, Вьетнам

Объект	N	<i>V. alginolyticus</i> (57)	<i>V. parahaemolyticus</i> (23)	<i>V. vulnificus</i> (5)	<i>V. harveyi</i> (9)	<i>V. furnissii</i> (7)	<i>V. fluvialis</i> (7)	<i>V. splendidus</i> (5)	<i>V. agarrivorans</i> (4)	<i>V. anguillarum</i> (5)	<i>V. minicus</i> (2)
Двустворчатые моллюски:											
<i>Ostrea</i> sp.	5	3	3	1	—	1	2	—	—	—	—
<i>Magallana bilineata</i>	5	2	1	—1	—	2	2	—	—	—	—
<i>Pinctada margaritifera</i>	5	4	2	—	—	—	2	—	—	—	—
<i>Saxostrea cucullata</i>	5	2	1	—	—	—	—	—	—	—	—
Брюхоногие моллюски:											
<i>Ergalatax</i> sp.	3	3	2	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Bursa granularis</i>	3	2	1	—	—	—	—	—	—	—	—
Морские ежи:											
<i>Salmaeis bicolor</i>	3	3	3	—	4	—	—	—	—	—	—
Морские звезды:											
<i>Sulcita novaeguineae</i>	1	2	—	—	—	—	—	—	—	1	—
Асцидии:											
<i>Didemnum molle</i>	3	5	—	1	—	—	—	—	—	—	—
Губки:											
<i>Niphates olemda</i>	2	4	—	—	—	1	—	—	—	—	—
Усоногие раки:											
<i>Amphibalanus</i> spp.	5	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Водоросли:											
<i>Caulerpa lentillifera</i>	3	3	—	—	—	1	1	—	—	—	—
<i>Fucus distichus</i>	3	3	2	—	—	—	—	—	2	—	—
<i>Gracilaria salicornia</i>	3	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Padina bovyana</i>	3	3	—	—	—	—	—	—	2	—	—
<i>Sargassum</i> sp.	3	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Морская вода	14	24	8	2	5	2	—	5	—	4	2

Примечание. Условные обозначения, как в табл. 2.

Таблица 4. Резистентность к антибиотикам изолятов из зал. Петра Великого

Антибиотик	R*/R**	V. fluv/8***	V. alg/110	V. harv/2	V. para/29	V. furn/1	V. spl 1/20	V. pom/3
Пенициллин	131/75.7	S	R (90)	R	R (26)	S	R (10)	R
Ампициллин	110/63.6	R (6)	R (73)	R	S (13)	R	R (12)	R
Оксациллин	173/100	R	R	R	R	R	R	R
Карбенициллин	119/68.8	R (6)	R (84)	R	R (19)	S	S (5)	S
Цефтазидим	16/9.25	S	S (12)	S	S (4)	S	S (3)	S
Стрептомицин	21/12.1	S	S (5)	R	S (13)	S	S (3)	S
Гентамицин	25/14.5	R	S (21)	S	S (4)	S	S	S
Ципрофлоксацин	29/16.8	S	S (16)	S	S (13)	S	S	S
Олеандомицин	173/100	R	R	R	R	R	R	R
Тетрациклин	43/24.9	S (3)	S (19)	S	R (18)	R	S (2)	S
Линкомицин	173/100	R	R	R	R	R	R	R
Левомецетин	3/1.7	S	S	S	S (3)	S	S	S
Рифампицин	0	S	S	S	S	S	S	S
Полимиксин В	44/25.4	S	S (24)	S	R (20)	S	S	S
0–129/10 мкг	112/64.7	R	R (74)	S	R (21)	R	S (8)	S
0–129/150 мкг	11/6.4	S	S (8)	S	S (3)	S	S	S

*Количество резистентных штаммов; **процент резистентных штаммов; ***вид и количество выделенных штаммов. Примечание. Названия видов вибрионов, как в табл. 1; R – резистентный штамм, S – чувствительный к данному антибиотику штамм; в скобках указано количество резистентных штаммов.

предпочитает высокие температуры (Austin, Zhang, 2006). Однако показано, что температура не оказывает значительного влияния на вибриофлору; более значимый лимитирующий фактор – наличие органического вещества (Eiler et al., 2007). Появляется все больше свидетельств того, что многие патогенные бактерии, в том числе *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* и *V. vulnificus*, могут выживать в суровых условиях окружающей среды в течение продолжительного периода времени в “жизнеспособном, но не культурубельном” состоянии (Igbiosa, Okoh, 2008). Исследователи также полагают, что рост числа инфекций у морских позвоночных и беспозвоночных и даже у людей связан с повышением температуры морской воды и распространением патогенных микроорганизмов в более высокие широты.

Помимо *V. harveyi* из дальневосточного тропанга нами выделен штамм *V. pomeroi*. Этот вид также считается патогеном для иглокожих и ранее в зал. Петра Великого был выявлен из морского ежа *Mesocentrotus nudus* (см.: Беленева, Кухлевский, 2010). Приуроченность *V. harveyi* и *V. pomeroi* к иглокожим дает основание рассматривать этих животных в качестве экологической ниши для патогенов. В двустворчатых моллюсках нами обнаружены патогенные *V. furnissii* и *V. fluvialis*. Все виды анализируемых моллюсков съедобны и очень популярны у любителей морепродуктов. Санитарно-эпидемиологические правила и нормы (СанПиН, 2002) в качестве контроля про-

дуктов из гидробионтов предусматривают выявление только *V. parahaemolyticus*, а другие многочисленные виды морских вибрионов остаются без внимания. Возможно, поэтому в прибрежных зонах Дальневосточного федерального округа в теплое время года часто регистрируются случаи острых кишечных инфекций неустановленной этиологии.

В зал. Нячанг, как и в зал. Петра Великого, преобладающими были *V. alginolyticus* и *V. parahaemolyticus*, причем последний вид встречался здесь значительно чаще, чем в умеренной зоне. Третье место по встречаемости занимал *V. harveyi*. В литературе сообщается, что на вьетнамских рынках в креветке *V. parahaemolyticus* встречается чаще, чем *V. alginolyticus* (см.: Tra et al., 2016). Парагемолитические вибрионы вызывают массовую гибель креветок (Dang et al., 2018). В 1997 и 1999 гг. во время обследования пациентов с диареей в провинции Кхань Хоа (Вьетнам) было выявлено 523 штамма *V. parahaemolyticus* (см.: Chowdhury et al., 2004). Авторы полагают, что 49% штаммов относятся к пандемическим штаммам, возникшим в 1996 г. и распространившимся во многих странах. Исследование заболеваний культивируемого морского конька *Hippocampus* spp. во Вьетнаме выявило преобладание в больших животных *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* и *V. harveyi* (см.: Dang et al., 2016). *V. harveyi* является причиной массовых вспышек заболеваний культивируемых гидробионтов во Вьетнаме и в Таиланде, а также в ряде

Таблица 5. Резистентность к антибиотикам изолятов из зал. Нячанг

Антибиотик	R*/R**	V. fluv/7	V. alg /57	V. harv/9	V. para/23	V. furn/7	V. spl 2/5	V. agar /4	V. vuln/5	V. ang/5	V. mim/2
Пенициллин	113/91.1	R	R	R	R	R	M	R	R	S	R (1)
Ампициллин	112/90.3	R	R(48)	R	R	R	R	R(2)	R	R	R (1)
Оксациллин	124/100	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Карбенициллин	124/100	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Цефтазидим	26/21.0	S (2)	S (11)	S (2)	S (5)	S (1)	S (1)	S	R (3)	S (1)	S
Стрептомицин	41/33.1	R (5)	S (5)	R	R (14)	S (2)	R (3)	S	R (3)	R	R
Гентамицин	53/43.1	R	S (26)	S (2)	S (5)	S (2)	S (1)	S	R	R	S
Ципрофлоксацин	58/46.8	R (5)	R (29)	S (2)	R (13)	S (2)	S (1)	S	R (3)	R (3)	S
Олеандомицин	124/100	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
Тетрациклин	74/59.7	R (4)	R (31)	S (4)	R (20)	R (5)	R (3)	S (1)	R	R (4)	R
Линкомицин	124/100	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Левомецетин	21/16.9	S (2)	S (3)	S (2)	S (8)	S (3)	S (1)	S	S (1)	S (1)	S
Рифампицин	7/5.6	S (2)	S	S (1)	S (2)	S (1)	S	S	S (1)	S	S
Полимиксин В	47/37.9	S (3)	S (18)	S (2)	R (14)	S (3)	S	S	R	S (2)	S
0–129/10 мкг	104/83.8	R	R	R	R (18)	R (6)	S (2)	S	S	R	S
0–129/150 мкг	12/9.7	S	S (6)	S	S (4)	S (2)	S	S	S	S	S

Примечание. Обозначения, как в табл. 1, 4.

стран Юго-Восточной Азии и Латинской Америки (Buller, 2004; Austin, Zhang, 2006).

Следует отметить, что в тропической зоне нами были выделены штаммы *V. splendidus* II биотипа, которые считаются патогенными для некоторых гидробионтов (Gomes-Gil et al., 2014), и не обнаружены *V. splendidus* I биотипа, распространенные в зал. Петра Великого. Штаммы *V. anguillarum*, *V. furnissii* и *V. vulnificus* были выделены нами из воды только в местах расположения хозяйств марикультуры. Неблагополучное состояние объектов можно было оценить даже визуально: вода была очень мутной, на поверхности плавало много мусора (ст. 2 и 8). В танках с рыбой (ст. 3) концентрация кислорода была низкой, встречалась даже погибшая рыба. Томпсон с коллегами (Thompson et al., 2004) отмечают, что в условиях искусственного культивирования при высокой плотности гидробионтов, концентрации органического вещества и массовом применении антибиотиков патогенный потенциал конкретных штаммов вибрионов имеет решающее значение.

Ранее продуценты антибиотиков – актиномицеты считались источником генов лекарственной резистентности. Однако в настоящее время установлено, что любые природные бактерии являются естественным резервуаром генов устойчивости к антибиотикам, которые затем могут быть переданы клинически значимым бактериям с помощью мобильных генетических элементов (García-Aljaro et al., 2014).

Вибрионы, выявленные в зал. Петра Великого, были устойчивы к 5–8 из 15 тестированных антибиотиков (табл. 4). При этом максимальную резистентность изоляты обеих климатических зон показали к β -лактамам. Устойчивость к пенициллину, ампициллину и карбенициллину широко распространена; нередки случаи, когда все выделенные изоляты устойчивы к ним (Thompson et al., 2004). Устойчивость к тетрациклину неуклонно растет, он популярен в практике аквакультуры до настоящего времени, а ранее был одним из первых антибиотиков, активных в отношении грамотрицательных бактерий (Tra et al., 2016). Устойчивость к гентамицину и стрептомицину проявляют от 4 до 100% изолятов *Vibrio*; эти препараты также распространены в аквакультуре. Фторхинолоны в аквакультуре не используются, как правило, вибрионы к ним чувствительны, а встречающаяся устойчивость обусловлена генными мутациями (Gomes-Gil et al., 2014).

При сравнении чувствительности изолятов *Vibrio* из природных и искусственных экосистем в разных частях Мирового океана наблюдается пестрая картина. Относительно невысокая лекарственная устойчивость вибрионов характерна для хозяйств аквакультуры, где менеджмент обеспечивает оптимальные условия содержания гидро-

бионтов, а плохие условия диктуют применение антибиотиков в качестве профилактической и терапевтической меры. Подобная практика способствует селекции устойчивых клонов, так как изменяет структуру микробных популяций и за пределами марихозяйств (García-Aljaro et al., 2014). В мире регистрируются как фатально высокие уровни устойчивости вибрионов к лекарственным препаратам, когда до 70% изолятов показывают мультирезистентность (Thompson et al., 2004) к 10 и более препаратам (Baker-Austin et al., 2008), так и очень низкие (Blanch et al., 2009). В нашем исследовании устойчивость к наибольшему числу антибиотиков (10–12) продемонстрировали изоляты из зал. Нячанг. Этот результат, очевидно, обусловлен широким применением антимикробных препаратов в марикультуре тропической зоны, а также отсутствием очистных сооружений в населенных пунктах, окружающих залив (Nguyen et al., 2013). Наши данные подчеркивают важность рутинного скрининга большого количества штаммов *Vibrio*, содержащихся в окружающей среде, на наличие устойчивости к широкому набору антимикробных препаратов для обеспечения, в частности, базы данных для клинических целей.

На фоне широкого использования метагеномного анализа и изучения популяционной структуры патогенных бактерий ученые все более склоняются к выводу, что при неблагоприятных условиях определенный гипервирулентный штамм или клон получает преимущества и становится доминантным в любом бактериальном сообществе (Rubio-Portillo et al., 2018) – в организме человека, гидробионта или системе культивирования гидробионтов. Именно штамм, а не вид в целом, является возбудителем заболевания. Данная точка зрения еще раз подтверждает предположение о том, что многие виды *Vibrio* являются оппортунистическими патогенами. Обычно вибриозами поражаются люди с низким иммунным статусом. Плохая экологическая обстановка в зонах обитания или культивирования гидробионтов также способствует возникновению у них спорадических заболеваний или вспышек инфекций, вызванных вибрионами. Безусловно, контроль за распространением вибрионов в морской среде является необходимым инструментом для предотвращения вспышек заболеваний у человека и животных. Информация о их разнообразии и биологических свойствах поможет прогнозировать сценарии модификации микробиоценозов, появления патогенов, усиления устойчивости к антибиотикам, а также расширит наши возможности в поиске пробиотиков и других эффективных продуцентов, перспективных для биотехнологии.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке проекта Дальний Восток 18-4-050.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую признательность д. б. н. заместителю директора по науке Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН (г. Москва) В.А. Карпову за предоставленную возможность проводить исследования на базе Приморского отделения российско-вьетнамского тропического научно-исследовательского и технологического центра (ТЦ), Нячанг, Вьетнам; Nguyen Van Trieu, сотруднику отдела тропикостойкости ТЦ за помощь в отборе проб и Л.Д. Куличковой за данные по гидрологической характеристике вод зал. Восток. Экспериментальная часть работы была частично выполнена на базе НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова согласно Договору оказания научно-технических услуг между ННЦМБ ДВО РАН и НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова от 17.04.2018 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Беленева И.А., Кухлевский А.Д. Характеристика *Vibrio gigantis* и *V. rotteroyi*, выделенных из беспозвоночных животных залива Петра Великого, Японское море // Микробиология. 2010. Т. 79. № 3. Р. 422–427.

Беленева И.А., Магарламов Т.Ю., Кухлевский А.Д. Характеристика, идентификация и скрининг на продукцию тетродотоксина бактерий, ассоциированных с немуртиной *Cephalotrix simula* (Ivata, 1952) // Микробиология. 2014. Т. 83. № 3. С. 312–319.

Беленева И.А., Масленникова Э.Ф., Магарламов Т.Ю. Физиолого-биохимические свойства галофильных вибрионов *Vibrio parahaemolyticus* и *V. alginolyticus*, изолированных из гидробионтов залива Петра Великого Японского моря // Биол. моря. 2004. Т. 30. № 2. С. 114–119.

Богатыренко Е.А., Бузалева Л.С. Характеристика бактериального сообщества кишечника дальневосточного трепанга *Apostichopus japonicus* // Микробиология. 2016. Т. 85. № 1. С. 92–99.

Лажнецова Л.Ю. Распространенность галофильных вибрионов в морских промысловых объектах и продуктах из них. Обзор // Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и северо-западной части Тихого океана. 2012. Вып. 26. С. 34–52.

Пугаева В.П., Устименко У.Ф., Сергеев Н.В. К вопросу о бактериальных патогенах камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* западного побережья Камчатки // Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и северо-западной части Тихого океана. 2002. Вып. 6. С. 318–322.

СанПиН 2.3.2.1078-01 “Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов” (с изменениями на 6 июля 2011 г.). М.: Минздрав, Россия. 2002.

Alcaide E. Numerical taxonomy of Vibrionaceae isolated from cultured Amberjack (*Seriola dumerili*) and surrounding water // Curr. Microbiol. 2003. V. 46. P. 184–189.

Austin B., Zhang X.-H. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates // Letters Appl. Microb. 2006. V. 43. № 2. P. 119–124.

Baker-Austin C., McArthur J.V., Tuckfield R.C. et al. Antibiotic resistance in the shellfish pathogen *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the coastal water and sediment of Georgia and South Carolina, USA // J. Food Prot. 2008. V. 71. P. 2552–2558.

Blanch A.R., C. Hispano, P. Bulto et al. Comparison of *Vibrio* spp. populations found in seawater, in exhibition aquaria, in fish intestine and in fish feed // J. Appl. Microbiol. 2009. V. 106. P. 57–65.

Buller N.B. Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals: A Practical Identification Manual. CABI Publishing. 2004. P. 394.

Cano-Gomez A., Bourne D.G., Hall M.R. et al. Molecular identification, typing and tracking of *Vibrio harveyi* in aquaculture systems: Current methods and future prospects // Aquaculture. 2009. V. 287. P. 1–10.

Chowdhury A., Ishibashi M., Vu D.T. et al. Emergence and serovar transition of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains isolated during a diarrhea outbreak in Vietnam between 1997 and 1999 // Microbiol. Immunol. 2004. V. 48. № 4. P. 319–327.

Clerissi C., Lorgeril J., Petton B. et al. Diversity and stability of microbiota are key factors associated to healthy and diseased *Crassostrea gigas* oysters // <https://t.co/VFp9hoX-lq5>. 2018.

Dang T.B., Vu D.H.Q., Tran Q.S., Truong T.O. Vibriosis in cultured seahorse (*Hippocampus* spp.) in Khanh Hoa Province, Vietnam // Int. J. Innov. Stud. Aquat. Biol. Fish. (IJISABF). 2016. V. 2. № 2. P. 43–50.

Dang T.H.O., Nguyen T.N., Tran V.T., Bondad-Reantaso M.G. Identification and characterization of *Vibrio* bacteria isolated from shrimp infected with early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis syndrome (EMS/AHPNS) in Viet Nam // Asian Fish. Sci. 2018. V. 31S. P. 283–292.

Eiler A., Gonzalez-Rey C., Allen S., Bertilsson S. Growth response of *Vibrio cholerae* and other *Vibrio* spp. to cyanobacterial dissolved organic matter and temperature in brackish water // FEMS Microbiol. Ecol. 2007. V. 60. № 3. P. 411–418.

García-Aljaro C., Riera-Heredia J., Blanch A.R. Antimicrobial resistance and presence of the SXT mobile element in *Vibrio* spp. isolated from aquaculture facilities // New Microbiol. 2014. V. 37. № 3. P. 339–346.

- Gomez-Gil B., Roque A., Turnbull J. F., Tron-Mayen L. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei* // Aquaculture. 1998. V. 163. P. 1–9.
- Gomez-Gil B., Thompson F.L., Thompson C.C., Swings J. *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2003. V. 53. № 1. P. 239–243.
- Gomez-Gil B., Thompson C.C., Matsumura Y. et al. Family Vibrionaceae (Chapter 225) // The Prokaryotes / Eds. Rosenberg E., DeLong E.F., Thompson F.L., Lory S., Stackebrandt E. 4th Edn. New York: Springer. 2014. P. 659–747.
- Hashimoto T., Takaya S., Kutsuna S. et al. A case report of *Vibrio furnissii* bacteremia and cellulitis in a malnourished patient without an apparent site of entry // J. Infect. Chemother. 2018. V. 24. № 1. P. 65–67.
- Hazen T.H., Pan L., Gu J.-D., Sobczyk P.A. The contribution of mobile genetic elements to the evolution and ecology of Vibrios // FEMS Microbiol. Ecol. 2010. V. 74. № 3. P. 485–499.
- Igbinsola E.O., Okoh A.I. Emerging *Vibrio* species: an unending threat to public health in developing countries // Res. Microbiol. 2008. V. 159. № 7–8. P. 495–506.
- Nguyen A.D., Zhao J.-X., Feng Y.-X. et al. Impact of recent coastal development and human activities on Nha Trang Bay, Vietnam: evidence from a *Porites lutea* geochemical record // Coral Reefs. 2013. V. 32. № 1. P. 181–193.
- Noguerola I., Blanch A.R. Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys // J. Appl. Microbiol. 2008. V. 105. P. 175–185.
- Oanh D.T., Pedersen K., Larsen J.L. Identification and characterization of *Vibrio* bacteria isolated from fish and shellfish in Vietnam // Diseases in Asian Aquaculture IV. Asian Fish. Soc., Manila. 2002. P. 73–85.
- Rivera-Posada J.A., Pratchett M., Cano-Gomez A. et al. Refined identification of *Vibrio* bacterial flora from *Acanthaster planci* based on biochemical profiling and analysis of housekeeping genes // Dis. of Aquat. Org. 2011. V. 96. P. 113–123.
- Rubio-Portillo E., Gago J.F., Martínez-García M. et al. *Vibrio* communities in scleractinian corals differ according to health status and geographic location in the Mediterranean Sea // Syst. Appl. Microbiol. 2018. V. 41. № 2. P. 131–138.
- Sawabe T. The mutual partnership between *Vibrio haliotocoli* and abalones // The Biology of Vibrios / Eds. F.L. Thompson et al. Washington, D.C. ASM Press. 2006. P. 219–230.
- Su Y.-C., Liu C. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety // Food Microbiol. 2007. V. 24. P. 549–558.
- Teo J.W.P., Suwanto A., Poh C.L. Novel β -lactamase genes from two environmental isolates of *Vibrio harveyi* // Antimicrob. Agents Chemother. 2000. V. 44. P. 1309–1314.
- Thompson F.L., Iida T., Swings J. Biodiversity of Vibrios // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2004. V. 68. № 3. P. 403–431.
- Tra V.T., Meng L., Pichpol D. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Vibrio* spp. in retail shrimps in Vietnam // Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 2016. V. 129. № 1–2. P. 48–51.
- West P.A., Brayton T.P.R., Briant T.N., Colwell R.R. Numerical taxonomy of Vibrios isolated from aquatic environments // Int. J. Syst. Bacteriol. 1986. V. 36. № 4. P. 531–543.

Vibrioflora of Hydrobionts and Waters of the Sea of Japan (Peter the Great Bay) and the South China Sea (Nha Trang Bay)

I. A. Beleneva

A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

Strains of *Vibrio* spp. isolated from samples of water and aquatic organisms of the temperate (173 strains) and tropical (124 strains) climatic zones were phenotypically characterized. Identification was carried out on the basis of an extended analysis of phenotypic properties made it possible to identify previously undiagnosed species. *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, and *V. splendidus* prevailed in Peter the Great Bay. It is the first report on isolation of *V. harveyi* from a hydrobiont of the temperate waters of Peter the Great Bay. Compared to the temperate zone, the tropical zone has a higher species diversity of vibrios. Vibrios from Peter the Great Bay were less resistant to the studied spectrum of antibiotics in comparison to the resistance of vibrios in the tropical zone. A *V. vulnificus* isolate from the Vietnamese waters was resistant to the maximum number of antibiotics (12 from 15).

Keywords: *Vibrio*, Sea of Japan, Nha Trang Bay, antibiotic resistance

УДК 519.237.8+57.018.4

СРАВНЕНИЕ КОМПЬЮТЕРНЫХ МЕТОДОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВОЗРАСТА ЖИВОТНЫХ

© 2020 г. В. В. Суханов^{1,2,*}, Н. И. Селин¹

¹Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток 690041, Россия

²Дальневосточный федеральный университет, Владивосток 690001, Россия

*e-mail: vsukhan@mail.ru

Поступила в редакцию 04.07.2019 г.

После доработки 21.10.2019 г.

Принята к публикации 28.11.2019 г.

В статье обсуждаются достоинства и недостатки статистических методов, позволяющих определять возраст животных, у которых отсутствуют регистрирующие структуры. Обсуждение сопровождается примерами из материалов по росту раковины двустворчатого моллюска *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1857). Возраст особей у данного вида хорошо определяется по морфологическим меткам на поверхности раковины. Это позволяет оценить процент ошибочного определения возраста при помощи той или иной статистической процедуры. Подробно протестированы следующие методы: построение гистограммы и кумуляты, дендрограммы, К-средних. Кратко описаны алгоритмы, положенные в их основу. Приведены рекомендации по применению данных методов на практике.

Ключевые слова: кластер, выделение возрастных групп, дендрограмма, метод К-средних

DOI: 10.31857/S0134347520050095

Изучение возрастной структуры популяции и роста составляющих ее особей представляет собой важную задачу, которую можно решить при помощи так называемых регистрирующих структур (Мина, Клевезаль, 1976). В этой роли выступают твердые нередко минерализованные части тела, не разлагающиеся в течение жизни животного: чешуя рыб, отолиты, зубы, кости, раковины и т.д. (Чугунова, 1959; Золотарев, 1989; Клевезаль, 2007; Клевезаль, Смирина, 2016, и др.). Годовые отметки на данных структурах, образующиеся из-за сезонной периодичности в процессе роста, позволяют определить возраст особи. Как правило, рост холодной зимой замедляется, а теплым летом ускоряется; пульсирующие изменения в скорости роста приводят к образованию годичных колец, напоминающих кольца роста на спилах деревьев.

Многие животные не имеют регистрирующих структур. Это членистоногие, у которых экзоскелет сбрасывается при каждой линьке, а также желелые, иглокожие и отдельные мягкотелые, у которых твердые образования, хранящие следы прошлого роста, или вовсе отсутствуют, или с возрастом редуцируются. Возраст таких организмов, если они растут в природе, а не в лабораторных условиях, определить невозможно. На по-

мощь может прийти следующее обстоятельство: в умеренных широтах процесс размножения животных в рамках года протекает в течение короткого периода времени. Как следствие, новорожденные особи компактной группой вливаются в популяцию почти одновременно. Прерывистый сезонный процесс размножения приводит к тому, что между соседними поколениями нередко существует разрыв, который обнаруживается в их распределении по размеру тела. Этот хиатус между генерациями позволяет трактовать такие размерные ступки как разновозрастные группы. Возникает задача выделения данных групп в размерном распределении особей.

Поскольку в разновозрастных “пакетах” особи похожи друг на друга по размерам, можно использовать классификационные методы для выделения однородных групп. Сравнение этих методов и выявление среди них наилучшего – главная цель настоящей работы.

Из обсуждения исключены растения, поскольку понятие “особь” имеет для них расплывчатый смысл из-за вегетативного способа размножения.

Тестирование методов следует проводить на реальном примере. При этом мы должны знать точный возраст особей, чтобы можно было под-

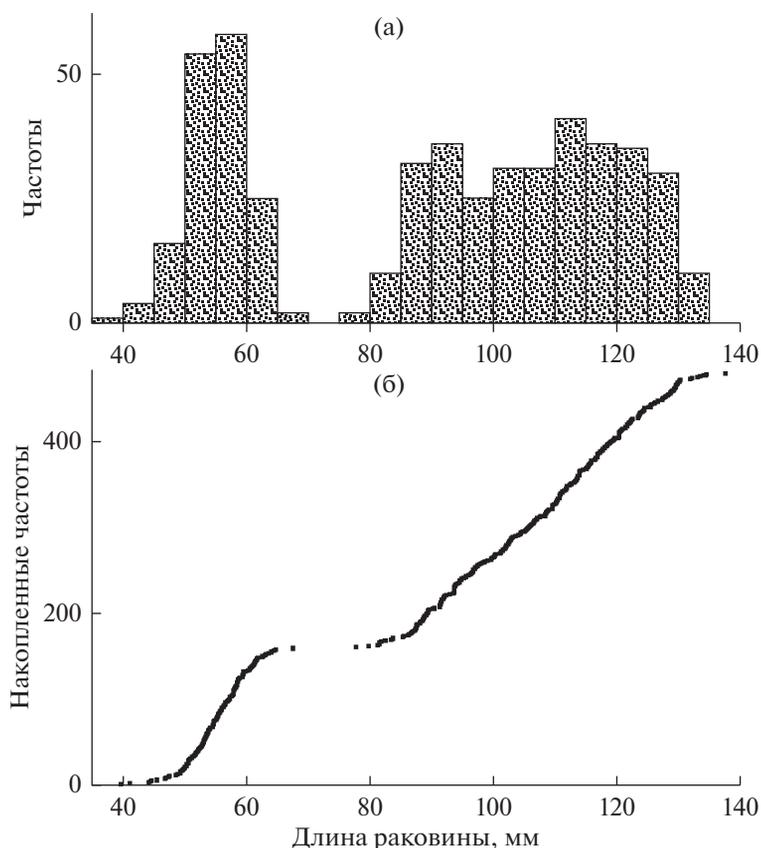


Рис. 1. Распределение числа особей *Mizuhopecten yessoensis* по длине раковины. а – гистограмма, б – кумюлята.

считать процент ошибочных определений возраста при использовании конкретного метода. Можно было бы воспользоваться искусственными тестовыми данными, сгенерировав на компьютере некую воображаемую выборку с заданными свойствами. Однако у полевых зоологов эти данные вряд ли вызовут доверие, так как при компьютерном синтезе искусственной выборки может быть упущено что-то важное, но нам неизвестное. Поэтому мы воспользовались конкретным материалом, взятым непосредственно из природы.

Тест-объектом послужил двустворчатый моллюск приморский гребешок *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1857) из сублиторального поселения в зал. Восток (зал. Петра Великого Японского моря). Выборка из 426 экз. была взята летом 1986 г. в течение трех дней, т.е. по сути является одномоментной. У каждой особи штангенциркулем с точностью до 0.1 мм измеряли два линейных параметра раковины – длину и высоту (см.: Скарлато, 1981). Индивидуальный возраст оценивали с помощью нескольких взаимодополняющих методов: по кольцам роста на нижней створке раковины и на лигаменте (Базикалова, 1934), а также по скульптуре верхней створки (Силина, 1978); последний метод ранее позволил оценить возраст-

ные изменения размеров моллюсков из поселения в зал. Восток, т.е. рост (Селин, 1989). Результаты измерения длины и высоты раковины в нашем исследовании служили исходными данными для оценивания возраста разными статистическими методами.

ПРОСТО РАСПРЕДЕЛЕНИЕ

Сравнительный анализ методов начнем с построения гистограммы – графика частотного распределения особей по размеру их тела, в частности, по длине створки (рис. 1а). В идеальном случае размерные и соответствующие им возрастные группы должны образовывать компактные сгустки частот, отделенные друг от друга разрывами. На рисунке слева видна только одна такая группа, состоящая из самых мелких особей. По-видимому, это однодневники. Правее по оси размеров едва заметны группы из более крупных особей. Но разрывы между ними выражены нечетко, а максимумы размыты, поэтому выделить и установить явные границы между возрастными когортами трудно. Очевидно, что гистограмма в примере с нашими данными неинформативна.

Существует другая форма графического представления частотных распределений. Это кумюля-

та. При ее построении все особи в выборке упорядочиваются по возрастанию величины признака. Затем формируется двухстолбцовая таблица: первый столбец — это номер особи в таком списке, второй столбец — значение самого признака (здесь — величина длины раковины). При построении графика кумуляты первый столбец обозначает “игреки”, второй — “иксы”, а сами особи изображаются точками.

Кумулята представляет собой возрастающую цепочку точек (рис. 1б). Это возрастание неравномерно. Можно увидеть ступеньку, разделяющую два участка, поднимающихся слева направо. Эта ступенька указывает на группу годовиков, также отчетливо видную на гистограмме (рис. 1а). В идеале при хорошо различимых размерных группах вся кумулята должна представлять собой лестницу, составленную из нескольких смежных ступенек. Но правый возрастающий участок здесь оказался однородным и не позволил выявить структуру у старших размерных групп. Следовательно, кумулята в нашем примере также не позволяет получить объективную информацию.

Построение гистограмм и кумулят исторически представляет собой первый способ обнаружения неоднородностей в размерных распределениях организмов. Математики называют такую задачу проблемой разделения смеси из нескольких нормальных распределений. Для этого разработаны расчетные методы и даже вспомогательные таблицы, давно вошедшие в математические энциклопедии, руководства и практику биологов (см., например: Harding, 1949; Cassie, 1954; Максимович, Погребов, 1986). Поводы для публикаций находятся и сейчас, особенно если удастся найти материал для красивой цветной картинки полимодального распределения (Зуенко, 2009).

В 1980-е годы произошла компьютерная революция. За прошедшее время статистики и специалисты в области анализа данных создали немало программ для классификации объектов. Большинство этих программ имеет дружелюбный интерфейс, удобный и понятный для неискушенных пользователей. С их помощью можно быстрее, эффективнее и точнее решать проблему разделения смеси как для единственного признака (у нас — размер раковины) и нормальных распределений (нам все равно, какие они у *M. yessoensis*), так и для расчета статистических моментов (объема возрастных групп, средней и дисперсии по размеру).

В классической задаче разделения смеси не достигается одна из основных целей — присвоение найденного возраста каждой конкретной особи в выборке. Если бы эта цель могла быть достигнута, то возраст можно было бы привязать к другим признакам особи — измеренным, но не привлеченным к задаче возрастной классифика-

ции. Тем самым можно было бы расширить круг вопросов для исследования собранного материала.

Мы склонны считать практически бесполезными методы непосредственного изучения реальных размерных распределений. В настоящий обзор они включены лишь для полноты картины, из почтения к исторически первому подходу к решению данной группы задач. Подобное мы испытываем в музее, глядя на абак (деревянные бухгалтерские счеты) и удивляясь тому, что в течение сотен лет вычислительная поддержка цивилизации обеспечивалась таким архаичным инструментом.

НАСТРОЙКА МЕТОДОВ

Упомянутые далее методы желательно подвергнуть предварительной настройке. Во-первых, можно выбрать способ обезразмеривания признаков, характеризующих особей. В простейшем случае эти признаки измеряются в одних и тех же единицах. В нашем примере длина и высота раковины моллюска измеряются в миллиметрах. В случае полноценного морфометрического исследования список измеряемых признаков может достигать нескольких десятков. При этом размерности признаков могут быть несравнимыми. Например, длина тела измеряется в сантиметрах, масса в граммах, а зрелость гонад в баллах. Чтобы стандартизировать количественные признаки, по умолчанию используют следующий прием. Из каждого конкретного измерения вычитают среднюю арифметическую по всем особям, а результат делят на среднеквадратическое отклонение, вычисленное также по всем особям в выборке. Итоговая переменная имеет среднюю, равную нулю, и стандартное отклонение, равное единице. После использования таких обезразмеренных признаков легко вернуться к исходным размерностям, выполнив цепочку обратных шагов. Существуют и другие способы стандартизации признаков. Чтобы снизить влияние так называемых выбросов (резко выделяющихся значений признаков), можно вместо непосредственных измерений использовать их логарифмы. Если в данных есть нули, то такой прием становится невозможным. В этом случае можно использовать преобразование двойного квадратного корня типа $\sqrt{\sqrt{\dots}}$. Если выбросов или пропущенных значений в массиве измерений слишком много, лучше изъять этих особей из анализа. Нередко такие аномалии представляют собой ошибки набора цифр при подготовке материала к компьютерной обработке.

В связи с этим важное значение может иметь погрешность прибора или метода, выбранного для измерения признаков. Пусть мы измеряем длину школьной линейкой с погрешностью 0.5 мм (половина цены деления линейки). Средняя длина

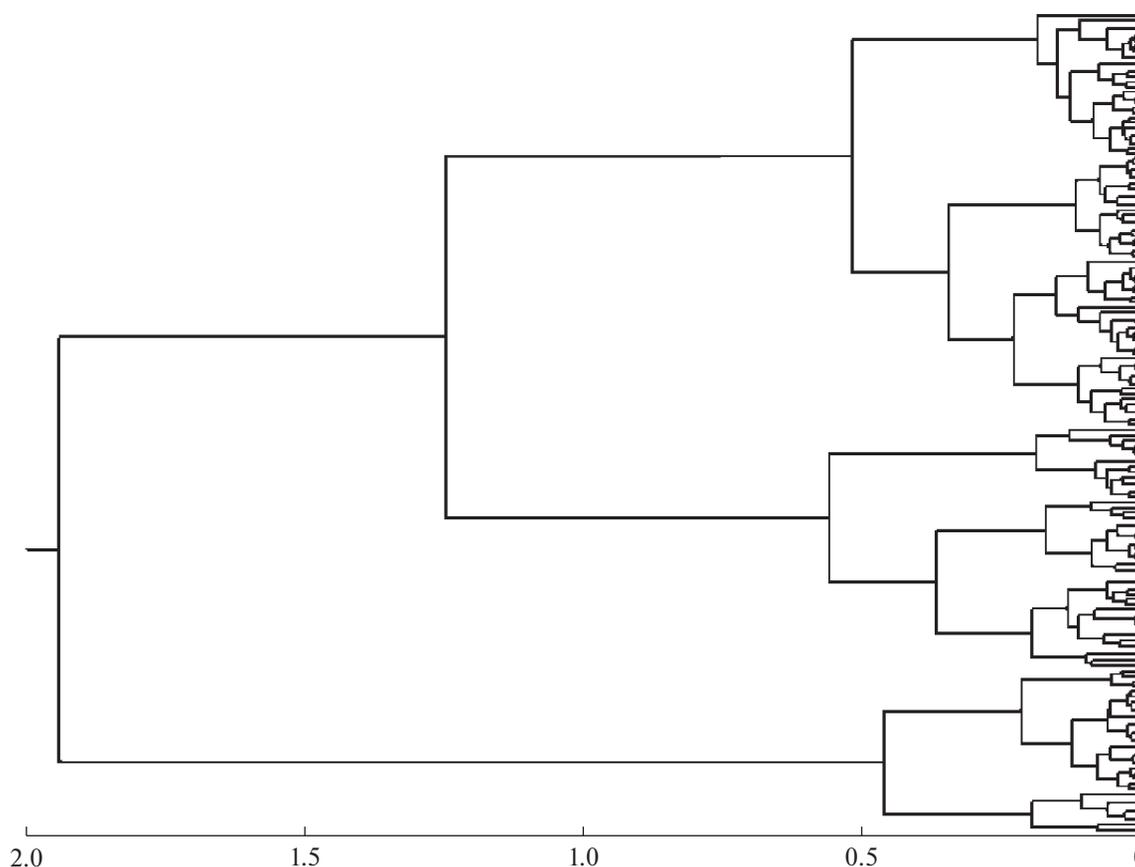


Рис. 2. Дендрограмма различия особей приморского гребешка по размерам раковины.

тела рыбы равна 10 см, а средняя, скажем, высота анального плавника составляет 5 мм. Тогда относительные погрешности измерения у этих признаков будут равны 0.5 и 10%. Вторым признаком, скорее всего, будет влиять на результаты классификации, уменьшая хиатусы между размерными группами, размывая их и увеличивая вероятность ошибки в определении возраста.

Во-вторых, можно выбрать метрику — способ измерения различий между особями и их групповыми объединениями. По умолчанию предлагается евклидово расстояние — обычное интуитивно понятное для всех расстояние. На прямой линии (когда признак единственный) это разница между значениями признака у двух сравниваемых особей. В двумерном случае (как в нашем примере с длиной и высотой раковины) — это расстояние на плоскости между двумя точками, изображающими сравниваемых особей. В трехмерном случае и более формула для расчета евклидова расстояния остается прежней. Существуют и другие способы измерения расстояний.

ДЕНДРОГРАММА

Метод построения дендрограмм позволяет строить древовидные изображения для описания

сходства или различия как непосредственно между особями, так и между их объединениями в однородные группы. Эти группы называют кластерами (гроздьями, пучками), а процедуру их построения — иерархической кластеризацией.

Иерархия здесь появляется из-за того, что в процессе кластеризации наиболее похожие по размерам особи объединяются в первичные группы, при этом значения признаков в данных группах пересчитываются по заданному правилу. В свою очередь, кластеры первого порядка объединяются в группы второго порядка, затем третьего и т.д. Так вырастает иерархическая древовидная структура. На каком-то уровне различия или сходства найденные кластеры интерпретируются как одновозрастные группы (рис. 2).

Количество возрастных групп в выборке определяется числом кластеров, обнаруженных на заданном уровне сходства/различия. На горизонтальной шкале на рис. 2 внизу отложены значения уровня различия. Если выбрать уровень, равный 0.3, то возрастных групп (ближайших кластеров, находящихся правее этого уровня) насчитывается 8; если уровень равен 0.4, то таких групп 6; если он равен 0.5, то число групп равно 5, а при уровне 0.7 их 3. Можно воспользоваться методом “каменистой осыпи”, чтобы выбрать уро-

вень, возле которого скорость объединений кластеров достигает максимума. Но эта рекомендация не гарантирует правильности такого выбора. Объективных общепринятых методов, позволяющих выбрать нужный уровень сходства/различия, пока не найдено. Данная неопределенность в трактовке результатов снижает ценность метода дендрограмм.

Еще один серьезный дефект метода дендрограмм может сильно усложнить идентификацию особей, попавших в разные кластеры. Эти особи изображены в правой части нашего графика, где представлены конечными “листьями” в кроне построенного дерева. Каждый лист дерева сопровождается номером особи в их общем списке. По идее эти номера позволяют опознать всех особей, включенных в тот или иной кластер. Но когда объем массива исходных данных превышает несколько десятков особей, их номера располагаются очень тесно и на графике налагаются друг на друга, не давая возможности прочесть числа. Именно поэтому номера особей мы не приводим. Протокол объединения кластеров, выводимый в выходной файл с результатами, в принципе позволяет проследить путь каждой особи от исходного листочка до корня дерева. Но такая расшифровка невозможна для больших массивов данных. Можно указать еще на один недостаток метода дендрограмм: после того как два объекта объединены, они не могут быть вновь разделены. Так, Кауфман и Рауссиов (Kaufman, Rousseeuw, 2005) отмечают, что “если дефект уже сделан, его никогда не исправить” (“once the damage is done, it can never be repaired”).

В методе дендрограмм имеются и другие проблемы. Они обсуждаются в работе Кафанова с соавторами (2004). На наш взгляд, самая серьезная из них заключается в принципиальной невозможности вмешаться в работу иерархической структуры классификации. Даже если реальная иерархия в данных отсутствует, она всегда будет фигурировать в дендрограммах принудительно. Это может породить странные и трудноуловимые артефакты.

К-СРЕДНИЕ (K-MEANS)

Данный метод включен во многие статистические компьютерные программы. Он характеризуется устойчивостью получаемых результатов, часто не требует жестких ограничений на объем обрабатываемого материала и очень прост по замыслу. В контексте нашей задачи существование метода К-средних можно описать следующим образом (Hartigan, 1975). Сначала весь массив отсортированных по возрастанию наблюдений “нарезают” на заранее predetermined число размерных классов. Для каждого класса вычисляют среднюю арифметическую. Затем каждое наблюдение про-

веряют на его близость к каждой из этих подсчитанных средних. Его помещают в тот размерный класс, средняя арифметическая которого оказалась самой близкой к данному наблюдению. При этом некоторые наблюдения покидают прежние размерные классы и перемещаются в другие группы. Формируется новое содержимое размерных классов, для которых необходимо вновь пересчитывать средние арифметические. Такая процедура начинается заново, и этот процесс повторяется до тех пор, пока новые итерации не перестанут корректировать установившееся равновесное состояние. Таким образом, алгоритм метода К-средних стремится минимизировать сумму квадратов отклонений между отдельными наблюдениями внутри каждого размерного класса и между средней арифметической для этого же класса.

Здесь существуют три методические проблемы. Во-первых, не всегда понятно, с какого возраста следует начинать отсчет возрастной структуры в изучаемой коллекции. Во-вторых, почти всегда заранее неизвестно количество возрастных классов (кластеров), на которые нужно разбивать материал. В-третьих, не установлены начальные значения границ, разделяющих эти кластеры. Первая проблема может показаться надуманной. Беглый взгляд на рис. 1 приводит к правдоподобному выводу: левый изолированный кластер особей обозначает годовиков. Но по принятым здесь правилам информация о возрасте приморского гребешка полностью отсутствует и нельзя определить минимальную границу для всего диапазона возрастов. В таких случаях можно использовать грубые оценки по косвенным данным. Так, в качестве предварительной прикидки может оказаться полезной линейная регрессия вида: $\ln(D) = 1.13 + 0.80\ln(L)$, где D – среднее время генерации в популяциях данного вида (годы), L – средний размер тела (м). Эту регрессию мы рассчитали по табл. 1 из книги Боннера (Bonner, 1965). Регрессия довольно груба, но охватывает большой диапазон размеров тела организмов, равный девяти порядкам: от одного микрона для *Staphylococcus aureus* до 80 м для *Sequoia gigantea*.

По предлагаемой здесь регрессии при известном среднем размере раковин можно вычислить среднее время генерации у приморского гребешка. Оно должно быть равно 1.34 годам. В качестве грубой прикидки данная оценка вполне годится. Поскольку из-за сезонности роста возрастные группы образуют ряд целых чисел 1, 2, 3, ..., минимальная возрастная группа – это годовики.

Вторая проблема решается следующим образом. Перед запуском на счет метода К-средних число кластеров устанавливается директивно. Статистические тесты показывают, что чем большее число групп задается, тем “лучше” оказываются результаты разбиения и меньше становится

Таблица 1. Статистические показатели возрастных групп двустворчатого моллюска *Mizuhopecten yessoensis*

Показатель	Возраст				
	1	2	3	4	5
Объем	160/160	128/85	96/67	64/91	32/77
Ср. длина	55.3/55.3	93.2/89.6	110.8/101.9	121.4/113.6	132.0/125.9
Ср. высота	56.8/56.8	93.7/89.3	109.4/101.2	119.0/111.8	126.4/123.0
СрКвОткл длины	4.96/4.96	6.41/4.29	4.48/3.50	3.63/3.38	2.72/4.29
СрКвОткл высоты	4.83/4.83	5.94/3.79	4.25/3.32	3.34/3.39	2.44/4.83

Примечание. Перед чертой – по реальным данным, за чертой – по кластерам.

дисперсия в группах. Однако задание чрезмерно большого числа классов может привести к тому, что в роли реальных объективно существующих кластеров на самом деле будут фигурировать чисто случайные статистические флюктуации материала. Поэтому для правильного определения числа групп используется следующий прием. Сначала метод К-средних запускается на счет с малым числом заданных кластеров. Затем проводятся дополнительные запуски, при этом каждый раз число заданных кластеров увеличивается на единицу. Параллельно отслеживается скорость падения дисперсии в группах (рис. 3). Темп снижения дисперсии у створок раковин приморского гребешка ослабевает при числе кластеров, расположенных между 4 и 6. Этот вывод дополнительно можно проверить при помощи дендрограммы.

Третья проблема также оказалась разрешимой. Алгоритм К-средних многократно стартовал из разных случайно выбранных начальных разбиений материала по классам. Затем по статистике *F*-ratio (об этом далее) среди них находился наилучший результат. Обычно такая селекция проводится автоматически средствами самой статистической программы.

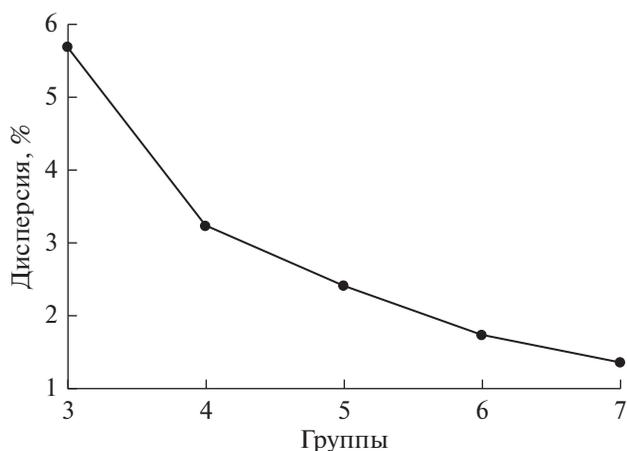


Рис. 3. Средняя дисперсия в кластерах для разного числа групп.

Подчеркнем, что метод К-средних не относится к иерархическим методам классификации (дендрограммам), хотя последние могут быть использованы здесь как вспомогательные процедуры. Иными словами, в результате работы этого метода получается разбиение, не обладающее какой-либо навязанной извне многоуровневой структурой. В нашем случае такое свойство метода К-средних можно считать его достоинством. По мнению статистиков, лучше всего метод К-средних работает, когда число наблюдений велико, а количество предполагаемых классов незначительно.

Подсчет ошибок в определении возраста моллюсков привел к результатам, которыми, очевидно, нельзя гордиться. Таких ошибок оказалось 26%. Улучшить этот результат не удалось. Мы проверили предположение о том, что использование не одного, а сразу нескольких (у нас двух) признаков может улучшить результаты классификации. Эта гипотеза подтвердилась. Когда для определения возраста привлекали лишь высоту раковины, то доля ошибочных определений достигала 32%, а когда лишь длину раковины – 40%. В процессе классификации тесно скоррелированные друг с другом признаки ослабляют влияние на результаты сильно отклоняющихся от нормы измерений.

Степень влияния каждого признака из комплекса на качество классификации можно оценить, используя критерий Фишера. С его помощью проверяется нулевая гипотеза о том, что полученное разбиение на кластеры достоверно не отличается от чисто случайного. Чем больше статистика Фишера (*F*-ratio) для данного признака, тем лучше. В нашем случае вероятность нулевой гипотезы была исчезающе малой для каждого из обоих признаков. Тем не менее для определения возраста высота раковины оказалась немного лучше, чем длина. Такой вывод подтверждают и проценты ошибок у этих признаков.

Распределение особей приморского гребешка в пространстве признаков (рис. 4) отчетливо демонстрирует замедление роста по мере взросления особей (снизу слева, вверх направо). Corre-

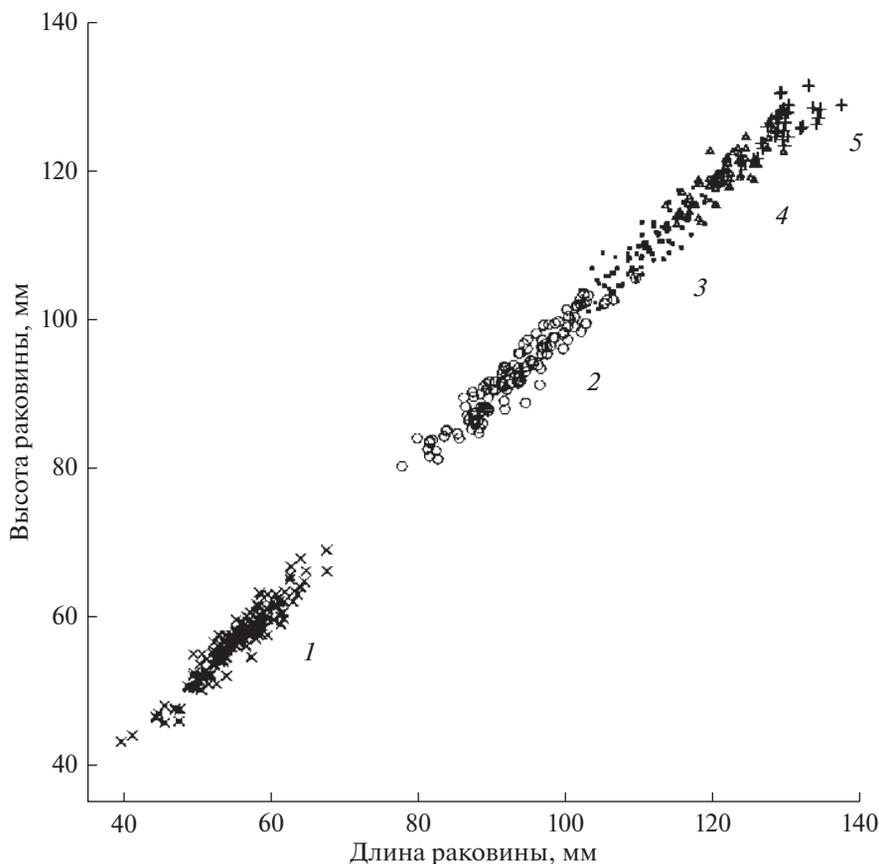


Рис. 4. Распределение особей приморского гребешка в пространстве признаков. Возраст особей (годы) указан справа от корреляционных эллипсов.

ляционные эллипсы становятся менее вытянутыми, более округлыми и все сильнее “въезжают” друг в друга. Особи из соседних возрастных групп перемешиваются особенно интенсивно как раз на стыках возрастных кластеров. Поэтому 26% ошибок в нашем случае — это вполне приемлемый результат.

Можно заметить (табл. 1), что рассчитанные по кластерам средние значения по размерам немного занижены по сравнению с реальными. При построении возрастного ключа (“размер → возраст”) это может приводить к завышению оценки возраста приблизительно на полгода для старших особей. Среднеквадратические отклонения в размерах (в табл. 1 обозначены как $SrKvОткл$, $StDev$) завышены для 5-годовиков. Объемы выборки занижены для 2- и 3-годовиков, а завышены для старших возрастов. Годовики определены безупречно.

Напомним еще о двух методах кластеризации, которые иногда встречаются в статистических пакетах. Это методы медоидов и нечетких множеств.

Медоиды (Medoids). Алгоритм пытается минимизировать не сумму квадратов отклонений

внутри групп, как в методе К-средних, а среднее несходство между всеми особями в группе.

Нечеткие множества (Fuzzy Sets). Здесь индивидуальный объект отнесен не к единственному, а ко всем кластерам одновременно, но с разными вероятностями принадлежности. При использовании нечетких множеств легко обнаруживаются аномальные особи, с трудом поддающиеся кластеризации: вероятности принадлежности такого объекта к разным кластерам примерно одинаковы, и с уверенностью нельзя выбрать среди них наилучший вариант. Оба метода — суть непринципиальные модификации метода К-средних. Поэтому анализ этих непопулярных методов мы опустим.

Таким образом, по удобству использования и легкости трактовки лучшую работу показал метод К-средних. Ошибки в определении возраста особей приморского гребешка — это немалые 26%. Однако, если ничего лучшего нет, это неплохой результат. Данный метод широко представлен в статистических пакетах и имеет хорошую репутацию у специалистов. По их мнению, лучше всего метод К-средних работает, когда количество наблюдений велико, а число предполагаемых клас-

сов незначительно. Именно с этим сталкиваются зоологи при попытках определения возраста у животных без регистрирующих структур.

Качество работы метода К-средних улучшается, если использовать не один, а сразу несколько количественных признаков. Чем точнее измерены признаки, тем меньше ошибок в определении возраста животного.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят анонимных рецензентов за полезные критические замечания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Базикалова А.Я. Возраст и темп роста *Pecten yessoensis* Jay // Изв. АН СССР. Отд. мат. и естеств. наук. 1934. № 2/3. С. 389–394.
- Золотарев В.Н. Склерохронология морских двустворчатых моллюсков. Киев: Наукова думка. 1989. 112 с.
- Зуенко Ю.И. Опыт использования функции нормального распределения для решения некоторых задач морской биологии // Изв. ТИНРО. 2009. Т. 156. С. 236–246.
- Кафанов А.И., Борисовец Е.Э., Волвенко И.В. О применении кластерного анализа в биогеографических классификациях // Журн. общ. биол. 2004. Т. 65. № 3. С. 250–265.
- Клевезаль Г.А. Принципы и методы определения возраста млекопитающих. М.: Товарищество науч. изд. КМК. 2007. 283 с.
- Клевезаль Г.А., Смирин Э.М. Регистрирующие структуры наземных позвоночных. Краткая история и современное состояние исследований // Зоол. журн. 2016. Т. 95. № 8. С. 872–896.
- Максимович Н.В., Погребов В.Б. Анализ количественных гидробиологических материалов: учеб. пособ. Л.: ЛГУ. 1986. 97 с.
- Мина М.В., Клевезаль Г.А. Рост животных. М.: Наука. 1976. 291 с.
- Селин Н.И. Распределение, структура поселений и рост приморского гребешка в заливе Восток Японского моря // Биол. моря. 1989. № 5. С. 24–29.
- Силина А.В. Определение возраста и темпа роста приморского гребешка по скульптуре поверхности раковины // Биол. моря. 1978. № 5. С. 29–39.
- Скарлато О.А. Двустворчатые моллюски умеренных широт западной части Тихого океана. Л.: Наука. 1981. 479 с.
- Чугунова Н.И. Руководство по изучению возраста и роста рыб [Текст]. (Метод. пособ. по ихтиологии). М.: Изд-во АН СССР. 1959. 164 с.
- Bonner J.T. Size and Cycle: An Essay on the Structure of Biology. Princeton, N.J.: Princeton Univ. Press. 1965. 219 p.
- Cassie R.M. Some uses of probability paper in the analysis of size frequency distributions // Aust. J. Mar. Freshwater Res. 1954. V. 5. P. 513–522.
- Harding J.P. The use of probability paper for the graphical analysis of polymodal frequency distributions // J. Mar. Biol. Assoc. U. K. 1949. V. 28. P. 141–153.
- Hartigan J.A. Clustering Algorithms. New York: Wiley. 1975. 351 p.
- Kaufman L., Rousseeuw P.J. Finding Groups in Data: An Introduction to Cluster Analysis. New York: Wiley. 2005. 342 p.

A Comparison of Computer-Based Methods for Estimating Age of Animals

V. V. Sukhanov^{a, b} and N. I. Selin^a

^aA.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia

^bFar Eastern Federal University, Vladivostok 690001, Russia

Advantages and disadvantages of the statistical methods for estimating age of animals that lack recording structures are discussed in the article. The discussion is supported by the examples from studies on growth of the bivalve mollusk *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1857). Age of individuals of this species can easily be determined by morphological marks on the shell surface. This makes it possible to calculate the percentage of erroneous age estimates through one or another statistical procedure. The following methods were comprehensively tested: building a histogram, cumulative frequency curve, and dendrogram, as well as K-means. The algorithms put at the basis of these methods are described in brief. Some practical recommendations on their use are provided.

Keywords: cluster, identification of age groups, dendrogram, K-means method

УДК 577.152.3:579.68

**АКТИВНОСТЬ О-ГЛИКОЗИДГИДРОЛАЗ И ДРУГИХ
ПОЛИСАХАРИД-ДЕГРАДИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ
У КУЛЬТИВИРУЕМЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИЗОЛЯТОВ КРАСНОЙ
ВОДОРОСЛИ *Ahnfeltia tobuchiensis*
(KANNO ET MATSUBARA, 1932) МАКИЕНКО, 1970**

© 2020 г. И. Ю. Бакунина¹, *, О. И. Недашковская¹, Л. А. Балабанова¹,
А. Д. Кухлевский², О. С. Белоус²

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
Владивосток 690022, Россия

²Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН,
Владивосток 690041, Россия

*e-mail: bakun@list.ru

Поступила в редакцию 21.11.2019 г.

После доработки 26.01.2020 г.

Принята к публикации 30.01.2020 г.

Впервые дана характеристика профилям активности О-гликозидгидролаз и альгинат-лиаз бактерий, ассоциированных с красной водорослью *Ahnfeltia tobuchiensis*, которые играют важную роль в трофических взаимоотношениях организмов хозяина и бактерий.

Ключевые слова: *Ahnfeltia tobuchiensis*, морские бактерии, О-гликозидгидролазы, альгинат-лиазы, полиманнуронат-лиазы, гликозидазы

DOI: 10.31857/S0134347520050022

В дальневосточных морях России неприкрепленная к субстрату красная водоросль *Ahnfeltia tobuchiensis* (Kanno et Matsubara, 1932) Makienko, 1970 (рис. 1) формирует обширные пласты толщиной от 0.1 до 1 м на илистом или илисто-песчаном грунте, которые могут занимать несколько десятков квадратных километров поверхности дна. Этот вид является важным компонентом морских экосистем из-за его вклада в очистку прибрежных вод, подверженных антропогенному загрязнению. К тому же *A. tobuchiensis* имеет значительную экономическую ценность как промышленный источник агара. Данный полисахарид нашел широкое применение в микробиологии и различных отраслях пищевой промышленности.

Хорошо известно, что бактерии колонизируют поверхность макроводорослей и в большинстве случаев эпифитные бактериальные сообщества весьма видоспецифичны (Goecke et al., 2010). Многие штаммы бактерий, выделенные из разных водорослей, способны разлагать продуцируемые водорослями-хозяевами полисахариды — альгинаты, целлюлозу и др. Считается, что бактерии участвуют в процессе распада водорослей благодаря ферментным системам, разлагающим полисахариды клеточной стенки до моно- и оли-

госахаридов. Сравнительное изучение таксономического положения штаммов с высокой степенью гидролитической активности необходимо для проведения направленного скрининга ферментов, представляющих интерес для медицины и биотехнологии.

Цели настоящей работы — изучение разнообразия активности О-гликозидгидролаз и других углеводов-деградирующих ферментов в бактериях, выделенных из микробного сообщества красной водоросли *A. tobuchiensis*, а также анализ распространения активности этих ферментов среди бактериальных продуцентов с разным таксономическим статусом.

Штаммы бактерий выделяли методом прямого высева из таллома красной водоросли *A. tobuchiensis* (рис. 1б), собранного со стороны Охотского моря вблизи о-ва Итуруп (Курильские острова) во время экспедиции на НИС “Академик Опарин”. Бактерии, изолированные в данном эксперименте, идентифицировали на основе стандартных фенотипических, хемотаксономических и генотипических характеристик, как описано ранее (Nedashkovskaya et al., 2007). Принадлежность к роду и виду определяли по последовательности нук-



Рис. 1. Внешний вид *Ahnfeltia tobuchiensis*. а – переплетенные талломы, б – разветвленная структура.

леотидов в гене 16S рРНК, а также по комбинации физиологических и биохимических характеристик штаммов (Бакунина и др., 2012).

Бактерии культивировали, получали бактериальные гомогенаты и экстракты, а также определяли концентрации белка и активность ферментов по стандартным методикам (Бакунина et al., 2013). В качестве субстратов для гликозидаз использовали хромогенные гликозиды (“Sigma-Aldrich”, США). За единицу стандартной активности (U) гликозидазы принимали такое количество фермента в 1 мл экстракта, под действием которого образуется 1 мкмоль *n*-НФ за 1 мин в условиях эксперимента. Удельную активность рассчитывали как отношение стандартных единиц на 1 мг белка.

Активность полисахарид-гидролаз (ЕС 3.2.1.-) и альгинат-лиаз (4.2.2.-) определяли по нарастающему восстановлению сахаров, как описано ранее (Бакунина et al., 2013). Количество восстанавливающих сахаров рассчитывали по оптической плотности растворов при 750 нм с помощью метода Шомоги–Нельсона. Калибровочные кривые строили для модельных растворов D-глюкозы (“Merck”, США) или L-фукозы (для фукоиданазы). За одну единицу стандартной активности фермента принимали такое его количество в 1 мл

экстракта, под действием которого высвобождается 1 мкмоль восстанавливающих сахаров за 1 мин.

В качестве субстратов для α - и β -галактозидазы, α - и β -глюкозидазы, α -N-ацетилгалактозаминидазы, α -фукозидазы, α -маннозидазы, α -ксилозидазы и β -N-ацетилглюкозаминидазы использовали *n*-нитрофенил- α - и β -D-галактопиранозиды, *n*-нитрофенил- α - и β -D-глюкопиранозиды, *n*-нитрофенил- α -N-ацетилгалактозаминид, *n*-нитрофенил- α -L-фукопиранозид, *n*-нитрофенил- α -D-маннопиранозид, *n*-нитрофенил- α -D-ксилопиранозид и *n*-нитрофенил- β -N-D-ацетилглюкозаминид соответственно.

Для детектирования активности ферментов, разлагающих полисахариды, в качестве субстратов использовали декстран, водорастворимый агар, амилозу, карбоксиметилцеллюлозу и полигулурановую кислоту, полученные от “Sigma-Aldrich” (США). Фукоидан из *Fucus evanescens* (α -1,3; 1,4-L-фукансульфат) (Урванцева и др., 2004), пустулан из лишайника *Umbilicaria rossica* (β -1,6-D-глюкан) (Звягинцева и др., 1986), ламинаран из *Laminaria cichorioides* (β -1,3; 1,6-D-глюкан) (Zvyagintseva et al., 2003), а также полиманнурановую кислоту из *Alaria fistulosa* (см.: Zvyagintseva et al., 2005) выделяли и очищали в лаборатории.

С поверхности красной водоросли *A. tobuchiensis* были выделены 284 чистые культуры бактерий. Детально были изучены профили O-гликозидгидролаз и полисахарид-лиаз 92 штаммов гетеротрофных бактерий. Сравнительный филогенетический анализ последовательностей 16S рРНК показал, что полученные бактерии-продуценты характеризовались богатым видовым разнообразием и относились к 69 филотипам четырех филумов, среди которых доминировали *Bacteroidetes* (45 штаммов – 48.9%) и *Proteobacteria* (39 штаммов – 42.4%); представителей *Actinobacteria* (7 штаммов – 7.6%) и *Firmicutes* (1 штамм – 1.1%) было значительно меньше. Следует отметить, что при полифазном анализе таксономической структуры

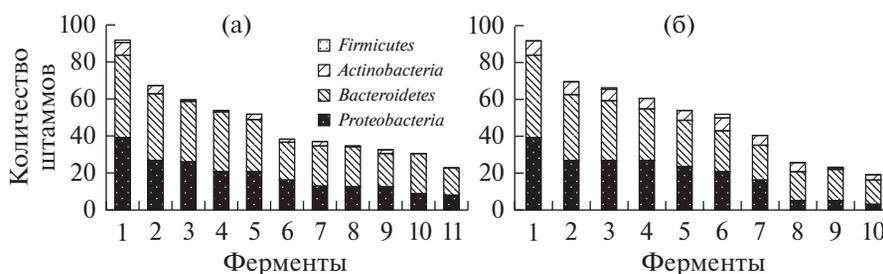


Рис. 2. Распределение активности полисахарид-гидролаз и полисахарид-лиаз среди представителей четырех филумов микробного сообщества (а), а также профили гликозидазной активности бактерий (б). (а): 2 – α -амилаза, 3 – полиманнуранат-лиаза, 4 – ламинариназа, 5 – полигулуранат-лиаза, 6 – фукоиданаза, 7 – декстраназа, 8 – каррагинаназа, 9 – пустуланаза, 10 – целлюлаза, 11 – агаразы; (б): 2 – β -N-ацетилглюкозаминидаза, 3 – α -глюкозидаза, 4 – β -галактозидаза, 5 – β -глюкозидаза, 6 – α -галактозидаза, 7 – α -ксилозидаза, 8 – α -маннозидаза, 9 – α -фукозидаза, 10 – α -N-ацетилгалактозаминидаза; 1 – общее количество изученных штаммов.

данного сообщества было установлено точное таксономическое положение двух новых для науки штаммов флавобактерий, которые обладали гликозидгидролазной активностью. Им были присвоены валидные названия *Flavobacterium ahnfeltiae* sp. nov. и *Polaribacter staley* sp. nov. (см.: Nedashkovskaya et al., 2014, 2018).

В результате скрининга были отобраны штаммы, показавшие наиболее высокую активность полисахарид-гидролаз и гликозидаз (22 и 16 соответственно). Продуценты полисахарид-гидролаз включали представителей 14 родов, среди которых наиболее часто встречались *Polaribacter*, *Winogradskyella* и *Zobellia* филума *Bacteroidetes*. Высокая активность гликозидаз отмечена у 16 штаммов, принадлежащих к 9 родам; преобладали представители *Amylibacter* филума *Proteobacteria*, *Salinibacterium* филума *Actinobacteria* и *Zobellia* филума *Bacteroidetes*.

Анализ распределения активности полисахарид-гидролаз и полисахарид-лиаз среди представителей четырех филумов микробного сообщества показал, что все сырые экстракты штаммов проявляли активность α -амилазы и α -глюкозидазы (рис. 2а, 2б: колонка 2 соответственно), которые участвуют в деградации крахмала – резервного полисахарида *A. tobuchiensis*. Активность полиманнуронат-лиаз, ламинариназ и полигулуронат-лиаз (рис. 2а: колонки 3, 4 и 5 соответственно), типичная для обитателей морской среды, также отмечена во всех экстрактах бактерий. Наиболее распространенными среди изолятов микробного сообщества *A. tobuchiensis* оказались β -N-ацетилглюкозаминидазы (рис. 2б: колонка 2). Эти гликозидазы часто детектировались у обитателей морской среды (Иванова и др., 1998; Бакунина и др., 2012; Балабанова и др., 2018). Они участвуют во многих важных физиологических процессах и входят в состав хитинлитического комплекса микроорганизмов. Редко встречались продуценты α -N-ацетилгалактозаминидазы (рис. 2б: колонка 9), а также фукоиданазы и каррагиназы, субстраты для которых (фукоидан и каррагинан) *A. tobuchiensis* не синтезируются.

Таким образом, впервые получены сведения о полисахарид-деградирующей активности культивируемых бактерий микробного сообщества красной водоросли *A. tobuchiensis*, которые характеризуются высоким метаболическим потенциалом, позволяющим бактериям определять жизненную стратегию и играть важную роль во взаимоотношениях с организмом-хозяином.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит материалов каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бакунина И.Ю., Недашковская О.И., Ким С.Б. и др. Разнообразие гликозидазных активностей бактерий филума *Bacteroidetes*, изолированных из морских водорослей // Микробиология. 2012. Т. 81. № 6. С. 688–695.

Балабанова Л.А., Бакунина И.Ю., Слепченко Л.В. и др. Полисахарид-деградирующая активность морских и наземных штаммов мицелиальных грибов // Биоорг. химия. 2018. Т. 44. № 4. С. 431–437.

Звягинцева Т.Н. А.с. № 1227199 СССР МКИ⁴ А 61 К 35/78. Способ получения пустулана / Звягинцева Т.Н., Елякова Л.А., Сундукова Е.В., Кривошекова О.Е., Мищенко Н.П. // заявл. 16.12.83.; опубл. 30.04.86. № 3741257/28-14. Бюл. № 16. 2 с.

Иванова Е.П., Бакунина И.Ю., Недашковская О.И. и др. Распространение морских микроорганизмов, продуцирующих β -N-ацетилглюкозаминидазы, α -галактозидазы, α -N-ацетилгалактозаминидазы // Биол. моря. 1998. Т. 24. № 6. С. 365–372.

Урванцева А.М., Бакунина И.Ю., Ким Н.Ю. и др. Выделение очищенного фукоидана из природного комплекса с полифенолами и его характеристика // Химия раст. сырья. 2004. № 3. С. 15–24.

Bakunina I.Y., Nedashkovskaya O.I., Balabanova L.A. et al. Comparative analysis of glycoside hydrolases activities from phylogenetically diverse marine bacteria of the genus *Arenibacter* // Mar. Drugs. 2013. V. 11. № 6. P. 1977–1998.

Goecke F., Labes A., Wiese J., Imhoff J.F. Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria // Mar. Ecol. Prog. Ser. 2010. V. 409. P. 267–299.

Nedashkovskaya O.I., Kim S.B., Shin D.S. et al. *Echinicola vietnamensis* sp. nov., a member of the phylum *Bacteroidetes* isolated from seawater // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. V. 57. 761–763. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.64546-0>

Nedashkovskaya O.I., Balabanova L.A., Zhukova N.V. et al. *Flavobacterium ahnfeltiae* sp. nov., a new marine polysaccharide degrading bacterium isolated from Pacific red alga // Arch. Microbiol. 2014. V. 196. № 10. P. 745–752.

Nedashkovskaya O.I., Kim S.-G., Balabanova L.A. et al. *Polaribacter staley* sp. nov., a polysaccharide-degrading marine bacterium isolated from the red alga *Ahnfeltia tobuchiensis* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. № 2. P. 623–629. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002554>

Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Chizhov A.O. et al. Water-soluble polysaccharides of some far Eastern brown algae. Distribution, structure and their dependence on developmental conditions // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2003. V. 294. № 1. P. 1–13.

Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Nazarenko E.L. et al. Water-soluble polysaccharides of some brown algae of the Russian Far East. Structure and biological action of low-molecular mass polyuronans // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2005. V. 320. № 2. P. 123–131.

Activities of O-Glycoside Hydrolases and Other Polysaccharide-Degrading Enzymes of Cultivable Bacterial Isolates of the Pacific Red Alga *Ahnfeltia tobuchiensis* (Kanno et Matsubara, 1932) Makienko, 1970

I. Y. Bakunina^a, O. I. Nedashkovskaya^a, L. A. Balabanova^a, A. D. Kukhlevsky^b, and O. S. Belous^b

^a*G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690022, Russia*

^b*A. V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia*

The profiles of bacterial O-glycoside hydrolases and alginate lyases associated with the red alga *Ahnfeltia tobuchiensis* are described for the first time. A role of these enzymes in the trophic relationships of the host-organism and bacteria is discussed.

Keywords: *Ahnfeltia tobuchiensis*, marine bacteria, O-glycoside hydrolases, alginate lyases, polymannuronate lyases, glycosidases